

Sanitized Copy Approved for Release 2010/02/12 : CIA-RDP83-00423R002000300004-2

25X1

Page Denied

25 YEAR RE-REVIEW

Sanitized Copy Approved for Release 2010/02/12 : CIA-RDP83-00423R002000300004-2

Arch. exper. Path. u. Pharmacol., Bd. 224, S. 476—482 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. EICHHOLTZ).

**Methodische Untersuchungen zur autoradiographischen
Darstellung wasserlöslicher Stoffe in der Niere*.**

Von

H. OSTER, H.-W. KUNDT und R. TAUGNER.**

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. November 1954.)

UNCLASSIFIED

Es ist bisher verschiedentlich versucht worden, die physiologischen Ausscheidungsvorgänge in der Niere näher zu lokalisieren. Man verwendete dazu u. a. Farbstoffinjektionen (HEIDENHAIN u. a.), Mikropunktion (RICHARDS u. WEARN, OLIVER u. Mitarb.), Mikrokryoskopie (WIRZ) und Bestimmungen des osmotischen Drucks an Nierenschnitten (ULLRICH u. Mitarb.). Die verfügbaren Methoden erlaubten jedoch nur die Lösung einzelner lokalisatorischer Probleme.

Weitere Fortschritte sind hier unseres Erachtens von der Autoradiographie zu erwarten. Ihre Verwendung würde davon ausgehen, daß sich i.v. injizierte radioaktive Isotope voraussichtlich an den Stellen des Nephrons anreichern, wo sie durch das Tubulusepithel hindurchtreten. Die Frage, ob es sich im einzelnen um Rückresorptions- oder Sekretionsprozesse handelt, bzw. ob die Anreicherung vom Tubulushumen oder von intertubulären Gefäßen her entsteht, sollte in Kontrollversuchen durch Ausschaltung der Filtration zu entscheiden sein. Die Filtration kann durch Drosselung der Nierenarterie bis zur Unterschreitung des Filtrationsdruckes oder durch Ligatur der Ureteren reduziert werden. In jedem Fall wäre die Zeit von der Isotopeninjektion bis zur Entnahme der Nieren so kurz zu wählen, daß die Aktivität zum überwiegenden Teil noch in der ursprünglichen chemischen Verbindung vorliegt.

Die Autoradiographie ist jedoch bisher zum Studium tubulärer Transport- bzw. Austauschvorgänge noch nicht herangezogen worden, wahrscheinlich, weil die üblichen Verfahren zur einwandfreien Darstellung nierenfähiger, d. h. wasserlöslicher Stoffe beschränkter Molekülgröße nicht geeignet sind. Ihre Mängel bestehen vor allem in der Elution von Radioaktivität während histologischer oder radiographischer Vorarbeiten. Gleichmäßige Aktivitätsverluste wären durch höhere Isotopengaben bzw. längere Exposition zwar leicht zu kompensieren.

* Herrn Prof. Dr. F. EICHHOLTZ zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Es ist jedoch selbst bei geringfügigen Auswaschungen damit zu rechnen, daß die Aktivität im Verlauf der Vorarbeiten aus einzelnen Nierenbezirken selektiv entfernt wird. Auch Dislokationen der Radioaktivität, u. a. durch Diffusion, könnten vorkommen und sich an der Niere, wo Strukturen mit verschiedenartiger Funktion nahe beisammen liegen, besonders irreführend auswirken. Wir suchten daher nach kritischer Prüfung bekannter Verfahren nach neuen, zuverlässigeren Methoden. Mit ihrer Hilfe sollte als erstes — in Fortsetzung früherer Arbeiten von TAUGNER u. Mitarb. — die Ausscheidung von trägerfreiem, P^{32} -markiertem Ortho- und Glycerophosphat studiert werden. Zur Verwendung kamen die Nieren von Ratten oder Katzen 5—30 min nach der i.v. Injektion von 1—3 mC radioaktiven Ortho- oder Glycerophosphats.

Experimenteller Teil.

Von verschiedener Seite sind — mit dem Ziel möglichst geringer Aktivitätsverluste — *abgekürzte Verfahren zur Gewebefixierung* beschrieben worden. So ermittelten LAMERTON und HARRIS bei 2stündiger Fixierung mit absolutem Alkohol (gefolgt von Xylol und Paraffin) eine Aktivitätseinbuße von nur 15%. HOLT, COWING und WARREN gelang es, die Elution von radioaktivem Orthophosphat durch Verkürzung der Formalin-Alkohol-Fixierung zu reduzieren. Als Einbettungsmittel verwendeten sie — nach Entwässerung mit Benzol oder Dioxan — ebenfalls Paraffin. Auch das freezing-drying-Verfahren, wo die Paraffineinbettung ohne vorhergehende Fixierung und damit ohne Aktivitätsverluste erfolgt, steht zur Diskussion (LEBLOND). Wir gingen von *Paraffinschnitten* aus, die nach den oben aufgeführten Methoden¹, außerdem nach abgekürzter Fixierung mit 96—98% igem Alkohol (2×6 Std, gefolgt von 2×30 min Benzol) sowie schulmäßiger Behandlung mit steigenden Alkoholkonzentrationen angefertigt waren. Die Schnitte wurden auf Wasser gestreckt, getrocknet, zum Teil mit Xylol entparaffiniert und schließlich mit einem Strippingfilm² versehen. Die Ergebnisse waren nicht befriedigend: Ähnlich wie bei der nachfolgend beschriebenen Aquaffineinbettung nach Alkoholfixierung war die Aktivität über den Rand der Gewebsschnitte hinaus disloziert. In den Versuchen mit Orthophosphat führte auch die Verwendung von Fällungsmitteln³ nicht zu besseren Resultaten.

Die Einflüsse eines 2. Einbettungsmittels studierten wir am Beispiel von *Aquaffin*⁴. Die Gewebstücke wurden anfangs nach den Angaben von TIETZ —

¹ Die Versuche mit dem freezing-drying-Verfahren verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Priv. Doz. Dr. HASELMANN, Anatomisches Institut der Universität, dem wir auch für verschiedene Ratschläge verpflichtet sind.

² Autoradiographic Plates der Fa. Kodak Ltd. London.

³ Bei der Fixierung kamen $CaCl_2$ mit Veronalpuffer (vgl. GOMORI), $FeCl_3$ oder $PbNO_3$ (in 96% igem Alkohol) sowie Ammoniummolybdat (in Salpetersäure-Pikrinsäure oder Alkohol-Salpetersäure) zur Anwendung. $CaCl_2$ mit Veronalpuffer wurde auch vor der Fixierung, während Streckung und Entparaffinierung sowie beim Aufbringen des Strippingfilms erprobt. Die Konzentration der Fällungsmittel wurde stufenweise bis zum Auftreten von Gewebsschädigungen bzw. bis zur Sättigung erhöht.

⁴ Aquaffin, ein Gemisch wasserlöslicher Polyäthylenglykole, wurde uns freundlicherweise von der Fa. Bayer-Leverkusen zur Verfügung gestellt.

ohne eigentliche Fixierung mit tiefgeköhltem Äthylenglykol entwässert. Das histologische Ergebnis war dabei immer unbefriedigend. Erheblichen Gewebszerstörungen entsprechend fanden sich bei der Autoradiographie mit Strippingfilm diffuse Schwärzungen, meist über den Rand der Schnitte hinaus. Ersatz der Äthylenglykolentwässerung durch Alkoholfixierung führte zu guten histologischen Ergebnissen. Die radiographischen Bilder entsprachen etwa denen nach Paraffineinbettung (Abb. 1 u. 2) und waren offensichtlich ebenfalls von Aktivitätsverschiebungen beeinflusst.

Diese, die Gültigkeit der erhaltenen Bilder in Frage stellende Aktivitätsverschiebung geht nach Kontrollversuchen mit anderen radiographischen Methoden haupt-

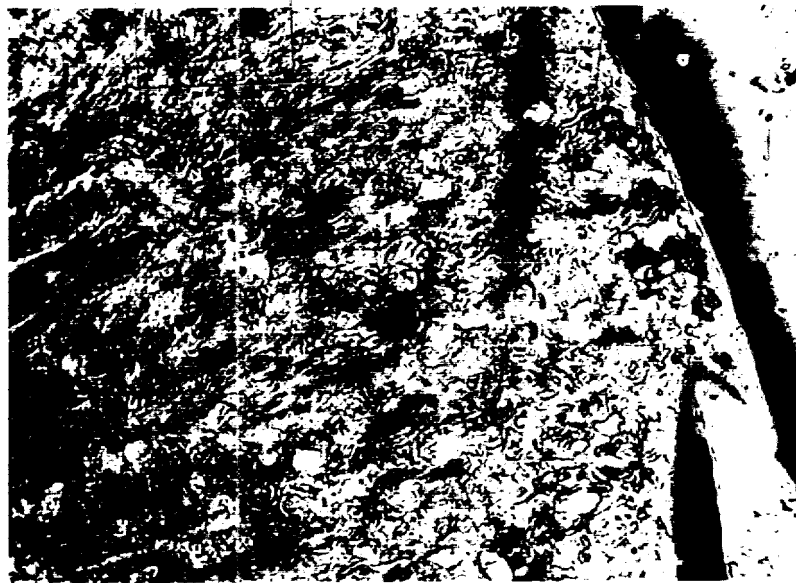


Abb. 1. Aquaffinschnitt (10 μ) aus der Niere einer Katze von 2 kg in Evipannarkose (90 mg/kg). Das Organ wurde 10 min nach i. v. Injektion von 3 mCi trägerfreier $H_2P^{32}O_4$ entnommen. Die Gewebstücke (5 \times 1–2 mm) befanden sich 2 \times 3 Std in 96% igem Alkohol (-20°), 2 Std in Alkohol-Aquaffin (Verhältnis 1 : 1, etwa 30° C) und 5 Std in Aquaffin ($47-50^\circ$ C). Das Aquaffin wurde herausgelöst mit einer Mischung von Aquaffin (1 Teil) und Aqua dest., mit Thymol gesättigt (9 Teile, vgl. TIETZ). Strippingfilm-Verfahren, Exposition 3 Wochen. Der unter dem Film befindliche Schnitt ist schwach mit Lichtgrün angefärbt. Man beachte die durch Elution bedingte diffuse Ausbreitung der radiographischen Zeichnung über den Rand des Schnittes hinaus.

sächlich zu Lasten des *Strippingfilm-Verfahrens*. Der Strippingfilm wird bekanntlich mit dem aufgezogenen Schnitt in Wasser aufgefangen. Trotz umgehender Trocknung im Exsiccator führt — bei der großen Oberfläche des Schnittes — diese kurze Wässerung zu wesentlichen Aktivitätsverschiebungen. Selbst wenn wir den Strippingfilm auf paraffinhaltige Schnitte, z. B. aus dem freezing-drying-Verfahren, aufzogen, kam es zu wesentlichen Aktivitätsverlusten.

Diese Fehler schienen durch Verwendung anderer radiographischer Methoden, z. B. des *Mounting-Verfahrens*, vermeidbar. Anstatt der dabei üblichen Streckung auf Wasser wurden die paraffinhaltigen Schnitte nach vorsichtiger Glättung mit

Pinseln -- auf den Film¹ gelagt und bis zum Anschmelzen erwärmt oder, eventuell nach Entparaffinierung, durch Auftropfen von Xylol geglättet. Auch das Verfahren von HOLT u. Mitarb., wonach sich das Strecken erübrigt, wenn man die Oberfläche des Blockes vor jedem Schnitt mit einer dünnen Schicht geschmolzenen Paraffins überzieht, wurde erprobt. Einige Gewebsschnitte wurden dem Film außerdem mit einem 2. Objektträger aufgepreßt. Die Ergebnisse waren bei derartigem Vorgehen insofern besser, als die radiographische Zeichnung den Rand der Schnitte nicht überlagte. Im Gegensatz zum Strippingfilm-Verfahren entstanden jedoch meist diffuse, strukturlose Bilder. Da dies auch ohne Entparaffinierung der Fall war, könnte es sich um Folgen von Fixierung, Entwässerung oder Paraffineinbettung handeln. Nach



Abb. 2. Vergrößerung des in Abb. 1 gekennzeichneten Abschnittes.

den Erfahrungen von LEBLOND mit dem freezing-drying-Verfahren bei Zufuhr größerer Jodmengen kann schon das Eindringen von Paraffin an der Schilddrüse zu diffusen Bildern führen. Die von ihm diskutierte Alternative, daß die Aktivität möglicherweise schon in vivo gleichmäßig verteilt sei, trifft nach unseren Ergebnissen mit Gefrierschnitten für die Anordnung von P^{32} in der Niere nicht zu. Die mit dem Strippingfilm-Verfahren erhaltenen differenzierten Bilder könnten allerdings nach den Erfahrungen mit der Mounting-Methode durch selektive Elutionen bedingt sein.

Nach diesen enttäuschenden Ergebnissen kamen für die Darstellung wasserlöslicher kleinmolekularer Stoffe nur noch *Gefrierschnitte*² nach

¹ In Ermangelung geeigneten Filmmaterials wurde auch hierzu Strippingfilm verwendet, der vorher mit der photographischen Emulsion nach oben aufgezogen und getrocknet worden war.

² Gefrierschnitte sind schon von ODEBLAD, jedoch bei vorheriger Formalin-Trichloressigsäure-Fixierung und späterer Verwendung wäßriger Medien benützt worden.

SCHULTZ-BRAUNS in Frage, die Fixierung, Entwässerung und Einbettung entbehrlich machen. Als radiographisches Verfahren scheint nur die *Kontaktmethode* zuverlässig. Wir fingen die Gefrierschnitte¹ anfangs bei Zimmertemperatur an Stelle von Objektträgern mit dem Film auf, wo sie durch Auftauen haften blieben. Die radiographischen Bilder waren jedoch, wahrscheinlich infolge dieses Auftauens, meist schollig verschmiert. Das Verfahren wurde daher für unsere Zwecke dahingehend modifiziert, daß die Schnitte in einer Kühlkammer bei -8 bis -5°C

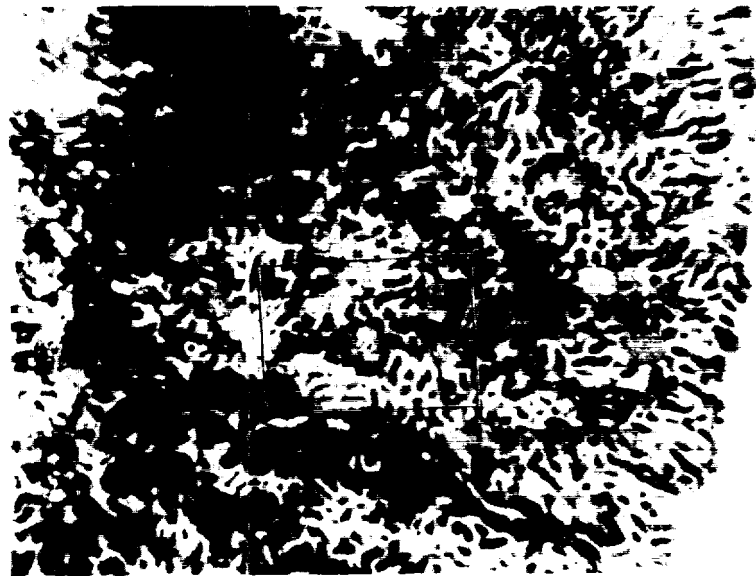


Abb. 3. Gefrierschnitt aus der Niere einer Ratte von 100 g, 10 min nach der i.v. Injektion von 2 μCi trägerfreiem, radioaktivem Glycerophosphat. Dicke des Schnitts: 10 μ , Exposition: 3 Wochen, Filmmaterial: Strippingfilm, nach dem Kontaktverfahren verwendet. Keine flüssigen Medien, kein Auftauen. Nähere Erläuterung siehe Text. Die Aufnahme gibt nur die radiographische Zeichnung ohne Schnitt wieder. Man beachte die Anhäufung der Aktivität im Bereich der Mark-Rinden-Grenze.

hergestellt und ohne jedes Auftauen bei -20° zur Exposition gelagert wurden.

Das Strecken erfolgte mit Pinseln auf dem tiefgekühlten Mikrotommesser. Anschließend legten wir die Schnitte auf vorgekühlte Objektträger. Das trockene Filmmaterial wurde mit Wäscheklammern darauf befestigt und 3–5 Wochen später getrennt entwickelt. Die Darstellung der zugehörigen Gewebsschicht kann an alternierend hergestellten, nicht zur Radiographie verwendeten Schnitten nach den Richtlinien von SCHULTZ-BRAUNS vorgenommen werden.

In den Abb. 3 u. 4 ist ein Beispiel für die Leistungsfähigkeit dieser wahrscheinlich optimalen — Methode wiedergegeben. Elutionen kommen

¹ Wir verwendeten das neue mit Messertiefkühlung ausgestattete Kohlensäure-Gefrier-Mikrotom CM der Fa. C. Jung-Heidelberg, das sich sehr gut bewährte.

Autoradiographische Darstellung wasserlöslicher Stoffe in der Niere. 481

als Fehlerquelle nicht in Frage. Auch Dislokationen dürften keine bedeutende Rolle spielen. Die Möglichkeit, daß der Film durch unfixiertes Gewebe beeinflußt wird (BOYD u. BOARD) kann in Parallelversuchen ohne Isotopeninjektion kontrolliert werden. Das Ergebnis ist allerdings, wie auch sonst bei der Kontaktmethode, von dem gleichmäßig engen Kontakt zwischen Film und Schnitt abhängig, der z. B. durch kleine Unebenheiten oder Falten gestört sein kann.



Abb. 4. Vergrößerung des in Abb. 3 gekennzeichneten Abschnittes.

Zusammenfassung.

Nach kritischer Prüfung bekannter Verfahren werden Gefrierschnitte nach SCHULTZ-BRAUNS zur autoradiographischen Darstellung wasserlöslicher Stoffe in der Niere empfohlen. Die Schnitte sollten zur Vermeidung des Auftauens in einer Kühlkammer hergestellt und für die Exposition in der Kälte gelagert werden.

Literatur.

BOYD, G. A., and F. A. BOARD: A preliminary report on histochemography. Science (Lancaster, Pa.) **110**, 586 (1949). — GOMORI, G.: Mikrotechnical demonstration of phosphatase in tissues. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 23 (1939). — HEIDENHAIN, R.: Versuche über den Vorgang der Harnabsonderung. Pflügers Arch. **9**, 1 (1874). — HOLT, M. W., R. F. COWING and S. WARREN: Preparation of radioautographs of tissues without loss of water-soluble P^{32} . Science (Lancaster, Pa.) **110**, 328 (1949). — LAMERTON, L. F., and HARRIS: Some autoradiographic studies of non-uniform distribution of radioactive phosphorus in tissues. Brit.

Arch. exper. Path. u. Pharmacol., Bd. 224.

32

482 OSTER, KUNDT u. TAUGNER: Autoradiographische Darstellung.

Med. J. 4737, 932 (1951). — LEBLOND, C. P.: Locating iodine in tissues autoradiographically, especially after fixation by freezing and drying. Stain Technol. 18, 159 (1943). — ODEBLAD, E.: A technique of Autoradiography. Scand. J. clin. Laborat. Investig. 3, 151 (1951). — SCHULTZ-BRAUNS, O.: Eine neue Methode des Gefrierschneidens für histologische Schnelluntersuchungen. Klin. Wschr. 1931, 113. — Verbesserungen und Erfahrungen bei der Anwendung der Methode des Gefrierschneidens unfixierter Gewebe. Zbl. Path. 54, 225 (1932). — TIETZ, H.: Eine Schnelleinbettungsmethode für histologische Präparate mit „Synthawachsgemischen“ unter Umgehung der Alkoholstufen, besonders nach Imbibition mit leicht wasser- und lipoid löslichen Stoffen. Z. wiss. Mikrosk. 61, 129 (1952). — ULLRICH, K. J., G. RIECKER u. H. H. JARAUSCH (Marburg): Untersuchungen zum Problem der Harnkonzentrierung und Verdünnung. Vortrag, gehalten auf dem Physiologen-Kongreß in Heidelberg am 16. September 1954. — WALKER, A. M., P. A. BOTT, J. OLIVER and M. C. MACDOWELL: The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. Amer. J. Physiol. 134, 580 (1941). — WEARN, J. T., and A. N. RICHARDS: Observations on the composition of glomerular urine with particular reference to the problem of reabsorption in the renal tubules. Amer. J. Physiol. 71, 209 (1924). — WIRZ, H.: Der osmotische Druck des Blutes in der Nierenpapille. Helvet. physiol. Acta 11, 20 (1953).

Dr. H. OSTER, Dr. H.-W. KUNDT und Dr. R. TAUGNER,
Heidelberg, Pharmakol. Inst. d. Universität.

Herrn Prof. EICHMOLTZ danken wir herzlich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und die vielseitige freundliche Förderung.

Dem Deutschen Komitee des „Williams-Waterman Fund of the Research Corporation (New York)“ gilt unser ganz besonderer Dank für die materielle Unterstützung.

Arch. exper. Path. u. Pharmacol., Bd. 224, S. 496—522 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. EICHHOLTZ).

**Papierchromatographische Trennungsmethode
für die säurelöslichen
Phosphorverbindungen aus Nierengewebe* **.**

Von

ECKEHART GERLACH und ELLEN WEBER.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Oktober 1954.)

UNCLASSIFIED

Verschiedenartige funktionelle Leistungen in Verbindung mit wichtigen Stoffwechselvorgängen und einem alle anderen Gewebe übertreffenden Energiebedarf weisen auf eine Sonderstellung der Niere unter den übrigen Organen hin. Alle exkretorischen Leistungen, besonders die tubulären Sekretions- und Resorptionsvorgänge und diesen parallel geschaltete Stoffwechselprozesse — Entgiftung körpereigener und exogen zugeführter Stoffe, Aufrechterhaltung ionaler Gleichgewichtszustände, Regulation des Säure-Basen-Haushaltes, Abbau, Trans- und Desaminierung von Aminosäuren — benötigen als gemeinsame Voraussetzung energieliefernde Reaktionen. Für die Übertragung und Freisetzung der aus dem intermediären Stoffwechsel gewonnenen Energie stehen dem Organismus verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, von denen eine, sicherlich sehr wichtige, die Bildung energiereicher Phosphorverbindungen ist. Es kann als wahrscheinlich gelten, daß auch in der Niere eine engere Verknüpfung besteht zwischen Phosphorstoffwechsel einerseits und energieverbrauchenden Stoffwechselvorgängen sowie funktionellen Leistungen andererseits.

MUDGE u. TAGGART konnten zeigen, daß eine einmalige Gabe von 10 mg Dinitrophenol/kg am Hund die Ausscheidung von p-Aminohippursäure, Phenolrot und Diodrast durch die Nieren blockiert. Aus Untersuchungen von TAGGART u. FORSTER ergab sich weiterhin, daß durch Dinitrophenol der Zelltransport von Phenolrot im gleichen Maße eingeschränkt wird, wie es zu einer Hemmung von Phosphorylierungsvorgängen kommt.

Dinitrophenol führt bekanntlich zu einer Verminderung energiereicher Phosphorverbindungen — besonders von ATP und Kreatinphosphat — und zur Entkopplung von Oxylation und Phosphorylierung. Die Wirkungsweise soll nach Untersuchungen von WITTER, NEWCOMB u. STOTZ und SIEKEVITZ u. V. R. POTTER

* Herrn Prof. EICI HOLTZ in Verehrung und Dankbarkeit zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen am 28. Juni 1954 aus Anlaß des III. Symposium in Freiburg, Brg. und am 5. Oktober 1954 während der 21. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Saarbrücken.

an Organhomogenaten über eine Aktivierung spezifischer Phosphatasen zu erklären sein. Inwieweit diese Erklärung für die Wirkung des Dinitrophenol am lebenden Organismus Gültigkeit hat, bleibt zunächst noch ungeklärt.

Die deutliche Beeinflussung des Exkretionsmechanismus der Niere durch Stoffe, die ihre Wirkung jedenfalls zum Teil über den Phosphorstoffwechsel entfalten, führt zu der Frage nach dem Gehalt der Niere an energiereichen P-Verbindungen. Bei stoffwechselchemischen Untersuchungen, die immer nur ein Momentbild des fortlaufenden Stoffwechselgeschehens wiederzugeben gestatten, werden nicht nur die energiereichen P-Ester erfaßt, sondern daneben eine Vielzahl ihrer Vor- und Abbau-stufen, die alle durch fermentgesteuerte Gleichgewichtsreaktionen zueinander in Beziehung stehen. Außerdem ist bei dem Fermentreichtum der Niere zu erwarten, daß die phosphorhaltigen Cofermente mit in die Analyse der P-Verbindungen eingehen. Die quantitative Erfassung möglichst vieler säurelöslicher P-Ester erscheint aber deshalb um so wünschenswerter, als sich vielleicht für einige pharmakologisch interessierende Substanzen der Angriffspunkt an energiereichen und anderen P-Estern ermitteln läßt.

Wohl wegen der großen methodischen Schwierigkeiten bei der gleichzeitigen Bestimmung zahlreicher P-Verbindungen aus Gewebsextrakten finden sich in der Literatur nur wenige Angaben über die Verteilung von P-Estern in der Niere. Mit den älteren, vor allem auf LOHMANN, WARBURG, v. EULER, EMBDEN u. a. zurückgehenden Methoden (Aufnahme der Hydrolysenkurven; Fällbarkeit von Phosphorverbindungen durch Barium, Schwermetalle, Brucin, Strychnin, Chinin; Bildung gefärbter Komplexe usw.) konnte nur eine unvollständige Aufschlüsselung der säurelöslichen organischen P-Verbindungen erreicht werden. Erst die in jüngerer Zeit eingeführte chromatographische Arbeitsweise mit Ionenaustauschern und die Papierchromatographie haben auch auf diesem Gebiet neue Möglichkeiten geschaffen.

Speziell für die Aufklärung des Phosphorsäurestoffwechsels im tierischen und pflanzlichen Gewebe ausgearbeitete papierchromatographische Methoden (HANES u. ISHERWOOD; MARKHAM u. SMITH; CARTER; BANDURSKI u. AXELROD; ZETTERSTRÖM u. LJUNGGREEN; BURROWS, GRYLLS u. HARRISON; EGGLESTON u. HEMS; FLECKENSTEIN u. GERLACH; FLECKENSTEIN u. JANKE; FLECKENSTEIN, JANKE, LECHNER u. BAUER und viele andere) haben zu einer Überprüfung und wesentlichen Erweiterung der früheren Ergebnisse geführt.

Ziel unserer im folgenden wiedergegebenen Untersuchungen sollte sein:

1. Ausarbeitung einer Methodik, die durch Kombination chemischer und papierchromatographischer Arbeitsweisen eine getrennte Erfassung der Mehrzahl säurelöslicher Phosphorverbindungen aus Nierengewebe gestattet;

2. Ermittlung der normalen Verteilung von organischen Phosphorsäureestern und Orthophosphat im Nierengewebe gesunder Ratten.

Experimenteller Teil.

Für alle Untersuchungen wurden männliche Ratten (Gewicht 180—250 g, Durchschnittsgewichte beider Nieren jeweils 1200—1500 mg) verwendet. Die Nahrung der Tiere bestand aus einem kalorien- und vitaminreichen Mischfutter.

Herstellung des trichloressigsauren Nierenextraktes.

Wegen der Notwendigkeit vergleichbarer Versuchsbedingungen werden die Tiere 18—24 Std ohne Nahrung nur mit ausreichender Wassermenge in einem Wärmeschrank von 22° C gehalten. Dann erfolgt die Tötung durch Dekapitation nach vorausgegangener Nackenschlagbetäubung. Die Nieren, noch in situ dekapuliert und vom Gefäßbündel und den Ureteren abgeschnitten, kommen innerhalb von 20—30 sec nach der Dekapitation in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser. Ihr Blutgehalt ist stets gering, da durch die Art der Tötung eine sehr rasche und gründliche Ausblutung des ganzen Tieres erfolgt¹.

Unter mehrfachen Zusatz von flüssigem Stickstoff werden die Nieren zu einem sehr feinen Pulver zerrieben, das in ein mit 10%iger TCS² von 0° C beschicktes, vorgewogenes Zentrifugenglas eingefüllt wird. Die angeschlossene Wiederwägung ergibt das Gewicht des zu extrahierenden Gewebepulvers. Eine kleine Menge des zerkleinerten Gewebematerials wird zur Trockengewichtsbestimmung eingewogen und über CaCl₂ bei 10° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das Nierengewebepulver wird in der 10%igen TCS (4,0 ml für 1000—1500 mg Gewebe) bei 0° C 5 min durch kräftiges Rühren extrahiert, auf —3 bis —5° C unter Vermeidung des Ausfrierens abgekühlt und dann 3 min scharf zentrifugiert. Mit der halben Menge 5%iger TCS erfolgt unter gleichen Bedingungen eine Nachextraktion. Die überstehenden Lösungen der beiden Extraktionsvorgänge werden zum TCS-Gesamtnierenextrakt vereinigt. Hiervon zweigen wir 0,5 ml (Fraktion 0) zur Bestimmung des säurelöslichen Gesamt-P und für gesonderte papierchromatographische Analyse ab. Kurzfristige Aufbewahrung dieser Fraktion bei —10 bis —15° C bis zur Weiterverarbeitung.

Fraktionierung des Nierenextraktes durch Barium-Alkoholfällung.

Voruntersuchungen ergaben, daß eine direkte papierchromatographische Auftrennung aller im TCS-Extrakt enthaltenen P-Verbindungen wegen ihrer Vielzahl und der Ähnlichkeit in den R_F-Werten mit den verschiedensten Lösungsmittelsystemen, sowohl ein-, als auch zweidimensional, nicht zu erreichen war. Eine chemische Vorfraktionierung wurde daher notwendig. Die Bildung schwer- und leichtlöslicher Bariumsalze der Phosphorsäureester wird schon seit Jahren für diese Zwecke ausgenutzt. Wir übernahmen die Standardmethode von LE PAGE und modifizierten sie dahingehend, daß eine exakte und quantitative Fraktionierung auch mit kleinsten Mengen des Ausgangsmaterials erreicht wurde, und eine ungestörte papierchromatographische Aufarbeitung angeschlossen werden konnte.

Alle Arbeitsgänge der im folgenden in ihren Einzelheiten beschriebenen Methode werden bei Temperaturen zwischen —5° C und +2° C ausgeführt.

¹ Entfernung der Nieren aus dem mit Äther narkotisierten Tier sowie isolierte Durchströmung der Nieren mit RINGER-Lösung zur Blutfreimachung wurden in Kontrollversuchen durchgeführt; die mit dieser Arbeitsweise erzielten Analyseergebnisse der P-Ester stimmten aber überein mit den unter obigen Bedingungen ermittelten.

² TCS: verwendete Abkürzung für Trichloressigsäure.

1. Einstellung des TCS-Gesamtnierenextraktes mit 3 n und 0,3 n KOH auf einen pH-Wert von 8,2 gegen Phenolphthalein¹. Zur Vermeidung einer lokalen Überalkalisierung ist dabei ständiges, kräftiges Rühren erforderlich. Es empfiehlt sich ein gelegentliches exaktes Nachmessen des pH-Wertes, da durch Abweichung von $\pm 0,5$ pH-Einheiten zur sauren oder alkalischen Seite die angeschlossene Bariumfraktionierung nicht mehr quantitativ gelingt.

2. Zusatz einer 25%igen Ba-Acetatlösung im Überschuß (nach LE PAGE benötigt theoretisch 1 mg Phosphor zur Fällung 8,2 mg Ba-Acetat oder 0,033 ml einer 25%igen Ba-Acetatlösung; praktisch ist jedoch für die quantitative Ausfällung ein $7\frac{1}{2}$ -facher Überschuß, also etwa 0,25 ml der 25%igen Ba-Acetatlösung/mg Phosphor, erforderlich). 20 min bei 0° C bis zur vollständigen Fällung der schwerlöslichen Ba-P-Ester stehen lassen und dann zentrifugieren. Die überstehende Lösung wird abgetrennt und in der Kälte gehalten.

3. Wegen der nachweislichen, schon von CORI u. CORI beschriebenen Mitfällung einer kleinen Menge der leichtlöslichen Ba-P-Ester in Form ihrer Doppelsalze erfolgt nach Wiederauflösung des Niederschlages in wenig 1 n HCOOH eine Umfällung der schwerlöslichen Ba-P-Ester. Zu diesem Zweck Einstellung der Ameisensäuren Lösung auf pH 8,2 (wie oben beschrieben), Zusatz noch einiger Tropfen der 25%igen Ba-Acetatlösung und wieder 20 min stehen lassen. Nach dem Abzentrifugieren werden die überstehenden Lösungen der 1. und 2. Bariumfällung vereinigt und ihr Volumen bestimmt.

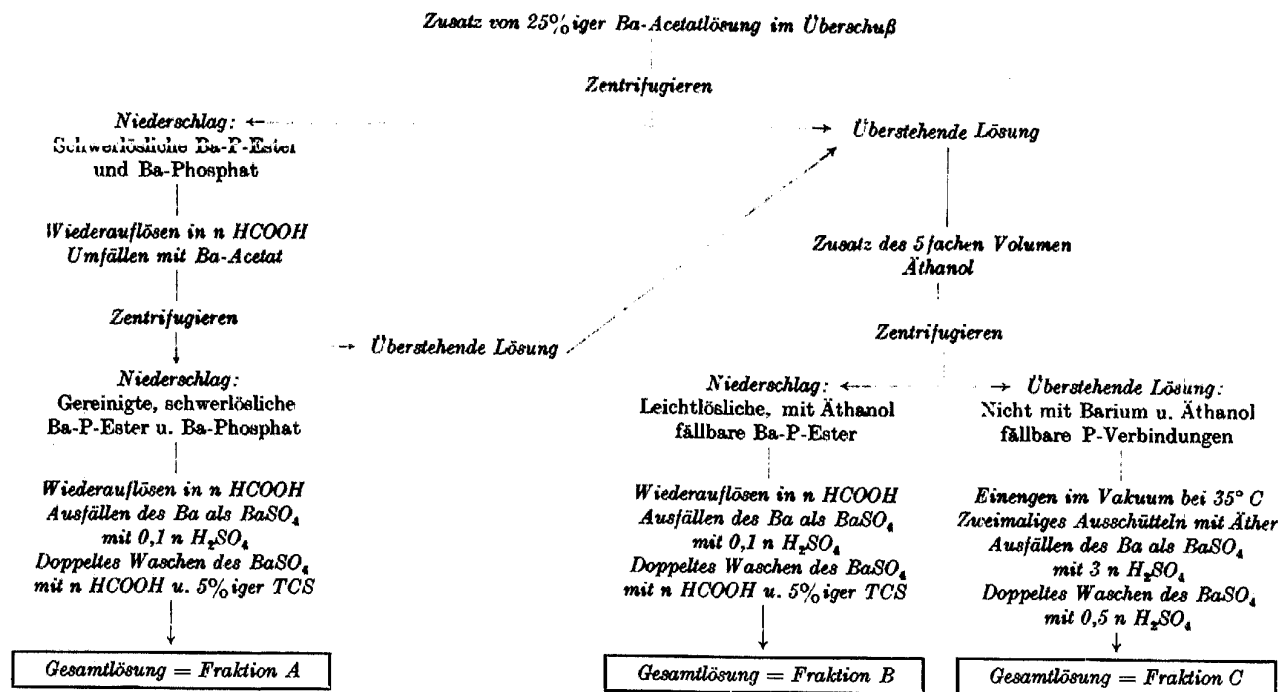
4. Der nunmehr nur noch die schwerlöslichen Ba-P-Ester und Ba-Phosphat enthaltende gelbe Niederschlag wird in ausreichender Menge 1 n Ameisensäure gelöst², mit einem minimalen Überschuß von 0,1 n H₂SO₄ zur Ausfällung des Bariums versetzt und abzentrifugiert. (Ein größerer Sulfatüberschuß muß durch Ba-Acetatlösung wieder zurückgefällt werden, da SO₄'' die papierchromatographische Identifizierung einiger P-Ester stören kann; vgl. Fußnote S. 502.) Anschließend zweimaliges gründliches Waschen des BaSO₄-Niederschlages mit 1 n Ameisensäure und 5%iger TCS und Vereinigung der Waschflüssigkeiten mit der überstehenden Lösung der BaSO₄-Fällung. Diese Gesamtlösung, deren Volumen gemessen wird, enthält die freien Säuren und Alkalisalze der P-Verbindungen, die mit Barium schwerlösliche Salze bilden; wir bezeichnen sie als *Fraktion A* (= bariumunlösliche Fraktion nach LE PAGE). Sie wird sofort papierchromatographisch weiterverarbeitet und ihr Gesamt-P-Gehalt gesondert bestimmt.

5. Die vereinigten überstehenden Lösungen der ersten und zweiten Bariumfällung werden mit dem 5fachen Volumen von reinem 96%igen Äthanol versetzt und anschließend der pH-Wert mit 0,3 n KOH wieder genau auf 8,2 eingestellt. Diese Lösung bleibt 45 min bei 0° C bis zur vollständigen Ausflockung der leichtlöslichen Ba-P-Ester stehen und wird dann scharf zentrifugiert. Die Auflösung des weißlich-gelben Niederschlages in 1 n Ameisensäure, die Ausfällung des Bariums mit 0,1 n H₂SO₄ und das Waschen des BaSO₄ erfolgt wie oben für die Fraktion A angegeben. In der so erhaltenen Gesamtlösung, deren Volumen bestimmt wird, liegen die mit

¹ Wegen der durch Flavinderivate bedingten Eigenfärbung des Extraktes ist der Umschlagspunkt durch einen orangen Farbton gekennzeichnet.

² Hierbei bleibt regelmäßig eine leichte, zentrifugierbare Trübung zurück. RABINOWITZ u. Mitarb. wiesen kürzlich darauf hin, daß nicht die ganze Menge des mit Barium fällbaren Coenzym A in Säuren wieder löslich ist. Ob in unserem Falle ein Teil der Trübung auf Coenzym A oder Bruchstücke dieses Fermentes zurückgeht, ist noch ungeklärt. Nachgewiesen werden konnte jedoch, daß sie in erster Linie durch BaSO₄ bedingt ist; denn dieses entsteht aus dem mit TCS extrahierbaren Sulfat des Nierengewebes und dem zugesetzten Ba-Acetat.

Schematische Übersicht einer fraktionierten Barium-Alkoholfällung von Phosphorsäureestern (nach LE PAGE, modifiziert).
Einstellen des Gesamt-TCS-Extraktes mit 3 n u. 0,3 n KOH auf pH 8,2 gegen Phenolphthalein.



500

E. GERLACH und E. WEBER:

Barium leichtlösliche Salze bildenden P-Verbindungen als freie Säuren und Alkalisalze vor; wir bezeichnen diese Lösung als *Fraktion B* (= bariumlöslich-alkoholunlösliche Fraktion nach LE PAGE). Sie wird bis zur papierchromatographischen Weiterverarbeitung und Bestimmung ihres Gesamt-P-Gehaltes eine Stunde bei — 10 bis — 15° C aufbewahrt.

6. Nach Abtrennung der durch Äthanolzusatz gefällten P-Ester enthält die als *Fraktion C* (= bariumlöslich-alkohollösliche Fraktion nach LE PAGE) bezeichnete überstehende Lösung solche P-Verbindungen, die unter den oben geschilderten Bedingungen nicht zur Ausfällung gebracht werden können. Wegen einiger methodischer Schwierigkeiten wird nach Einengen dieser Fraktion vorerst nur ihr Gesamtgehalt an Phosphor bestimmt.

Verteilung von Phosphorsäureestern auf die Fraktionen A, B und C.

Fraktion A

*Orthophosphat	PGS
*2- u. 3-Phosphoglycerinsäure	HDP
Hexose-1, 6-diphosphat	ATP
*Adenosin-5'-triphosphat	ADP
*Adenosin-5'-diphosphat	ITP
Inosin-5'-triphosphat	IDP
Inosin-5'-diphosphat	TPN
*Triphosphopyridinnucleotid	„NF“
*Weitere Nucleotidfraktionen	FAD
*Flavinadenin-Nucleotide	

Fraktion B

*Kreatinphosphat	Kr-P
*Phospho-enol-brenztraubensäure	PEB
*Triosephosphate	
(Dioxyaceton-phosphorsäure, Glycerinaldehyd-phosphorsäure und andere)	
Glucose-1-phosphat	G-1-P
*Glucose-6-phosphat	G-6-P
*Fructose-6-phosphat	F-6-P
Ribose-5-phosphat	R-5-P
*Adenosin-5'-monophosphat	5'-AMP
Adenosin-3'(bzw. 2')-monophosphat	3'-AMP
*Inosin-5'-monophosphat	IMP
*Cytidin-5'-monophosphat	CMP
Guanosin-5'-monophosphat	GMP
Uridin-5'-monophosphat	UMP
*Diphosphopyridinnucleotid	DPN
*Weitere Nucleotidfraktionen	„NF“
*Flavinderivate	

Fraktion C

*1,2-Propandiolphosphat
*Amino-äthylphosphat
*Weitere unbekannte P-Verbindungen.

Mit * gekennzeichnete Verbindungen kommen stets in fraktionierten Nierenextrakten vor. Die angegebenen Abkürzungen werden im folgenden für die P-Ester verwendet.

Grundsätzliche Verfahren bei der Papierchromatographie von Phosphorsäureestern.

1. Vorbehandlung der Papiere.

Whatman No. 1-Papiere, Größen 20×45 cm, 20×55 cm, 35×55 cm, werden 45 min in eine 0,5%ige wäßrige Lösung von äthylendiamintetraessigsäurem Natrium (pH 8,5) eingelegt und anschließend 6mal gründlich mit Aqua dest. gewaschen. Durch diese Behandlungsweise wird nach Angabe von EGGLESTON u. HEMS der Gehalt an Schwermetallionen und Phosphor im Papier stark reduziert. Nach unseren eigenen Ergebnissen enthalten vorgewaschene Papiere nur noch $1/10$ des in unbehandelten Papieren vorhandenen Phosphors.

2. Auftropfen der Lösungen.

Die eiskühlten Lösungen der chromatographisch aufzuarbeitenden Fraktionen werden mit Agla-Mikrometerspritzen in Tropfen von $5 \mu l$ punktförmig übereinander an der Startlinie aufgetragen und im Kaltluftstrom von 2 Föhnen getrocknet. Zur quantitativen Vergleichsbestimmung werden die Startpunkte stets doppelt angelegt. Anhaltspunkte für die jeweils aufzutragenden Mengen ergeben sich aus der Bestimmung des Phosphorgehaltes der einzelnen Fraktionen. Um optimale Trenneffekte zu erzielen, soll ein Startpunkt nicht mehr als 10–12 γ Phosphor enthalten.

3. Lokalisation und Entwicklung von Nucleotiden und anderen Phosphorverbindungen.

Die Lokalisation der Nucleotide erfolgt nach dem Photoprintverfahren (MARKHAM u. SMITH) bei 260 $m\mu$. Zur Sichtbarmachung aller P-haltigen Areale werden die trockenen Chromatogramme mit dem Molybdatreagens von HANES u. ISHERWOOD (25 ml 4%ige wäßrige Lösung von Ammoniummolybdat + 5 ml 60%ige $HClO_4$ + 10 ml 1 n HCl + 60 ml H_2O) besprayed, 7 min bei $85^\circ C$ gehalten und dann nach der Methode von BANDURSKI u. AXELROD mit ungefiltertem UV-Licht einer Quecksilberdampflampe 10–15 min bestrahlt. Durch beschleunigte Reduktion von Molybdät^{VI} unter Bildung von Molybdänblau an allen P-haltigen Stellen erscheinen diese tiefblau gefärbt auf weißem Grund¹.

4. Identifizierung der verschiedenen Phosphorverbindungen.

Orthophosphat bildet sofort nach dem Besprayen mit Molybdatreagens Ammoniumphosphormolybdat, das als gelber Fleck auf dem Papier sichtbar wird. Leicht hydrolysierbare P-Verbindungen spalten während der Trocknung der Chromatogramme bei $85^\circ C$ in 7 min soviel Orthophosphat ab, daß nach dieser Zeit auch Areale mit Kr-P, G-1-P, ATP und ADP als gelbgefärbte Stellen erkennbar sind.

Für die allgemeine Unterscheidung leicht- oder schwerhydrolysierbarer P-Ester dient der Ammoniak-Resistenz-Test (FLECKENSTEIN, GERLACH u. JANKE). Das aus den leichthydrolysierbaren Estern abgespaltene Orthophosphat gibt eine gegen Ammoniak resistente Blaufärbung mit Molybdat (Salzbildung), während die schwerhydrolysierbaren Verbindungen, die in 7 min nur wenig oder kein Phosphat

¹ Sulfat-Ionen in einer Konzentration von 0,5–1 γ/cm^2 geben unter denselben Bedingungen mit dem Ammoniummolybdat-Reagens und anschließender UV-Bestrahlung eine gegen Ammoniak beständige intensive Blaufärbung an den betreffenden Stellen der Chromatogramme. Dies ist zu beachten, wenn für papierchromatographische Untersuchungen Ba-Salze der P-Ester durch H_2SO_4 oder Sulfate in die freien Säuren oder Alkalisalze umgewandelt werden.

abspalten, eine durch Ammoniak auslöschbare Blaufärbung mit Molybdat zeigen (lockere Anlagerung des Molybdäns an esterartig gebundenes Phosphat).

Die Identifizierung von *Kreatinphosphat* auf dem Papier gelingt einfach nach der von WILLIAMS für die Erkennung von Kreatin und Kreatinin beschriebenen Methode. Besprayen der Chromatogramme mit einer 1,3%igen Lösung von Pikrinsäure in 96%igem Äthanol, 1 Std zur Umwandlung von Kreatin in Kreatinin bei 100—110° C halten, und neuerliches Sprayen mit einer 1 n NaOH-Lösung, wobei die charakteristische Orangefärbung des Kreatinins erscheint.

Phosphorylierte Pentosen und Hexosen werden mit den aus der Zucker-Chromatographie bekannten Reagenzien identifiziert. Wir verwenden als Sprayreagenzien:

1. Anilinphthalat nach PARTRIDGE (1,66 g Phthalsäure + 0,93 g Anilin, gelöst in 100,0 ml H₂O-gesättigtem n-Butanol).

2. m-Phenylendiamin nach CHARGAFF, modifiziert nach CHERNICK (0,2% m-Phenylendiamin-dichlorhydrat und 2% Oxalsäure · 2 H₂O in 96%igem Äthanol).

3. Benzidin nach HORROCKS (0,5 g Benzidin + 20 ml Eisessig + 80 ml 96%iges Äthanol).

4. Naphthoresorcin nach ISHERWOOD (gleiche Teile einer 0,2%igen Lösung von Naphthoresorcin in 96%igem Äthanol und einer 2%igen wäßrigen Lösung von Trichloressigsäure werden unmittelbar vor der Anwendung gemischt).

Die für die einzelnen Zucker-P-Ester charakteristischen Farbreaktionen erscheinen auf den besprayten Chromatogrammen nach 10—15 min Trocknung bei 100—110° C. Im Anschluß an die Zuckerreaktionen — besonders nach Anwendung von Anilinphthalat — kann mit Molybdatreagens zur Sichtbarmachung der Phosphorareale erneut gesprayed werden.

Für die allgemeine Erkennung von *Polyhydroxylverbindungen* eignet sich ein von HOCKENHULL angegebenes Sprayreagens: 1 Teil 0,05 n Natriumboratlösung vom pH 8,1, 2 Teile Phenolrotlösung (2 mg Phenolrot/ml Äthanol, mit NaOH eben alkalisch gestellt), 7 Teile Methanol. Wir benutzen dieses Reagens, um die Triosekomponente der Triosephosphate und andere Zucker-P-Ester in den Chromatogrammen als helle Flecke auf weinrotem Grund darzustellen.

Zur Erkennung und Identifizierung von *Nucleotiden* dienen:

1. die UV-Photographie bei 260 m μ nach dem Photoprintverfahren;
2. die R_F-Werte dieser Substanzen in bekannten und neuen Lösungsmitteln im Vergleich zu reinen Testsubstanzen¹ und definierten Nucleotidgemischen;

3. die sogenannte „Mischchromatographie“ (Zusatz eines bekannten Nucleotids in bestimmter Konzentration zu der zu chromatographierenden Lösung und quantitative Auswertung des fertigen Chromatogramms).

Schwefelhaltige Verbindungen werden mit den aus der Aminosäure-Chromatographie bekannten Farbreaktionen nachgewiesen. Für unsere Zwecke eignen sich besonders:

1. Natrium-Nitroprussid als „dipping“-Reagens nach TOENNIES u. KOLB (Reagens I: 1,5 g Na-Nitroprussid gelöst in 5 ml 2 n H₂SO₄ + 95 ml Methanol + 10 ml 25%ig. Ammoniak, filtrieren und in der Kälte aufbewahren; Reagens II: 2 g NaCN oder KCN, gelöst in 5 ml H₂O + 95 ml Methanol).

2. Jod-Azid-Reaktion nach CHARGAFF, LEVIN u. GREEN. Die Chromatogramme werden besprayed mit einer 0,05 n wäßrigen Jodlösung, die 1,5% Natriumazid enthält.

Bei der Erfassung von SH-, S-S- oder anderen leicht spaltbaren S-Bindungen geben wir der Nitroprussid-Reaktion ihrer größeren Empfindlichkeit wegen den Vorzug gegenüber der Jod-Azid-Reaktion.

¹ Ein Verzeichnis aller verwendeten Testsubstanzen findet sich am Schluß der Arbeit.

5. Quantitative Bestimmung der Phosphorverbindungen.

Alle P-haltigen Areale werden ausgeschnitten, mit 0,5—0,8 ml Veraschungsreagens (3 Teile 98% ige H_2SO_4 + 2 Teile 60% ige $HClO_4$) feucht verascht und der P-Gehalt nach der Methode von BERENBLUM u. CHAIN elektrophotometrisch (Elko II, Zeiss Opton, Filter S 75, Wellenlänge 750 m μ) bestimmt¹. Von diesen Werten wird der Phosphorgehalt des Papieres selbst — er beträgt durchschnittlich in allen, auch den 2-dimensionalen Chromatogrammen, 0,005—0,01 γ P/cm² — entsprechend den ausgeschnittenen Arealgrößen abgezogen; hierdurch gelangt man zu dem wirklichen P-Gehalt der erfaßten Verbindungen.

Spezielles Verfahren zur papierchromatographischen Aufarbeitung fraktionierter Nierenextrakte.

1. Verwendete Lösungsmittel (GERLACH, WEBER u. DÖRING).

- | | | |
|------|---|--------------------------|
| I. | 30 ml Diisopropyläther, | |
| | 30 ml n-Butanol, | |
| | 20 ml Ameisensäure (98—100% ig). | |
| II. | 45 ml Methy.-äthyl-keton oder Diisopropyläther, | |
| | 25 ml wassergesättigtes n-Butanol, | |
| | 5 ml n-Propanol, | |
| | 20 ml Ameisensäure (98—100% ig). | |
| III. | 15 ml 30% ige Trichloroessigsäure, | |
| | 25 ml 80% ige Ameisensäure, | |
| | 40 ml n-Butanol, | |
| | 20 ml n-Propanol, | |
| | 25 ml Aceton. | |
| IV. | 25 ml n-Propanol, | 15 ml Äthanol, |
| | 35 ml n-Butanol, | 10 ml n-Propanol, |
| | 35 ml Ammoniak (25% ig), | oder: 35 ml n-Butanol, |
| | 10 ml Wasser. | 35 ml Ammoniak (25% ig), |
| | | 10 ml Wasser. |

2. Papierchromatographie der Fraktionen O, A und B.

Fraktion O. Der als Fraktion O bezeichnete unveränderte Teil des TCS-Gesamtnierenextraktes wird auf Papierbogen 20 × 45 cm mit Lösungsmittel I bei 20° C „absteigend“ 2 × 18 Std chromatographiert. Sämtliche Nucleotide verbleiben an der Startlinie oder lokalisieren sich dicht oberhalb davon, während alle anderen P-Ester des Gesamtextraktes mehr oder weniger weite Strecken auf dem Papier zurücklegen,

¹ Da bei dieser Methode die Überführung des Ammonium-Phosphormolybdates in Isobutylalkohol quantitativ nur bei einer Konzentration von 0,05—1,5 n H_2SO_4 gelingt, darf die Veraschungsreagensmenge 0,8 ml nicht überschreiten. Gegebenenfalls muß bei Veraschung größerer Areale mit mehr Veraschungsreagens ein entsprechend höherer Wasserezusatz erfolgen.

ohne jedoch quantitativ voneinander abtrennbar zu sein. Lediglich Orthophosphat mit dem größten R_F -Wert in diesem Lösungsmittel wandert den übrigen Verbindungen soweit voraus, daß es absolut sicher isoliert erfaßt werden kann. Dieses Orthophosphat setzt sich aber zusammen aus dem im TCS-Gesamtextrakt enthaltenen freien Orthophosphat und dem aus Kr-P durch Einwirkung des sauren Lösungsmittels hydrolytisch abgespaltenen, so daß wir hier besser von „Orthophosphat + Kreatinphosphat“ sprechen.

Eine gemeinsame exakte Erfassung dieser beiden Verbindungen im unveränderten Nierenextrakt ist besonders wichtig. Nach der fraktionierten Fällung müssen die Werte für Orthophosphat aus Fraktion A und Kr-P aus Fraktion B addiert übereinstimmen mit den aus Fraktion O ermittelten für „Orthophosphat + Kreatinphosphat“. Diese Übereinstimmung kann als Maß für die Exaktheit der Fällungsbedingungen gelten; denn würde bei dieser chemischen Vorfraktionierung aus labilen P-Estern Orthophosphat abgespalten, so müßte sich der aus den Fraktionen A und B bestimmte Additions-wert für Orthophosphat und Kr-P gegenüber dem aus Fraktion O ermittelten nachweislich erhöht haben, was aber bei unserer Arbeitsweise nicht vorkommt. Tatsächlich liegt der Additions-wert stets tiefer als der direkt im TCS-Extrakt bestimmte; diese Differenz erklärt sich aus einem durchschnittlichen Verlust von 9,4% bei den Fällungsvorgängen.

Fraktion A. Die Papierchromatographie der Fraktion A erfolgt auf Papierbogen der Größen 20×55 cm. Zur Trennung des Orthophosphats und der 2- und 3-PGS von den Nucleotiden wird Lösungsmittel II bei 20°C „aufsteigend“ 16 Std oder — bei stärkerer Anreicherung der Fraktion A auf dem Papier — Lösungsmittel I bei 20°C „absteigend“ 8—12 Std angewendet. Für die aufsteigende Chromatographie übernahmen wir die von FLECKENSTEIN u. GERLACH angegebene Methodik (vgl. hierzu Abb. 1 und 2; dieses Arch. **219**, 534; 1953); unsere Abb. 1 zeigt ihre sinngemäße Übertragung auf die absteigende Chromatographie.

Während Orthophosphat in dieser Anordnung „auf- bzw. absteigend“ gegen das Ende EF des Papiers von der Startlinie etwa 12 bzw. 22 cm fortwandert, lokalisiert sich PGS ungefähr auf halbem Weg zwischen Startlinie und Orthophosphat. An der Startlinie selbst bleiben die Nucleotide der Fraktion A scharf begrenzt zurück (vgl. Abb. 2). Lediglich ein Teil der mit Barium fällbaren Flavinderivate wandert 2—3 cm von der Startlinie fort.

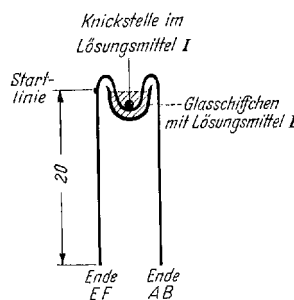
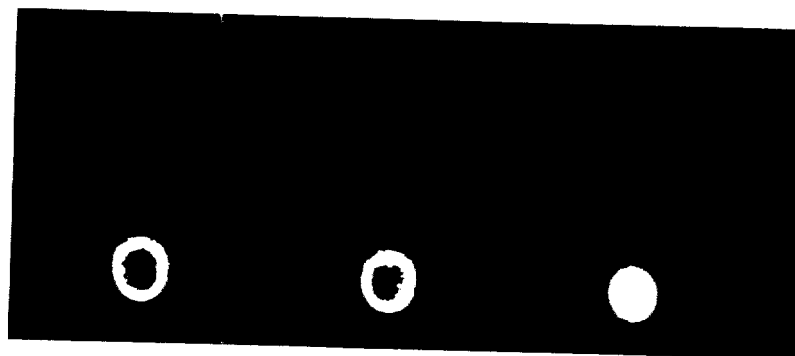


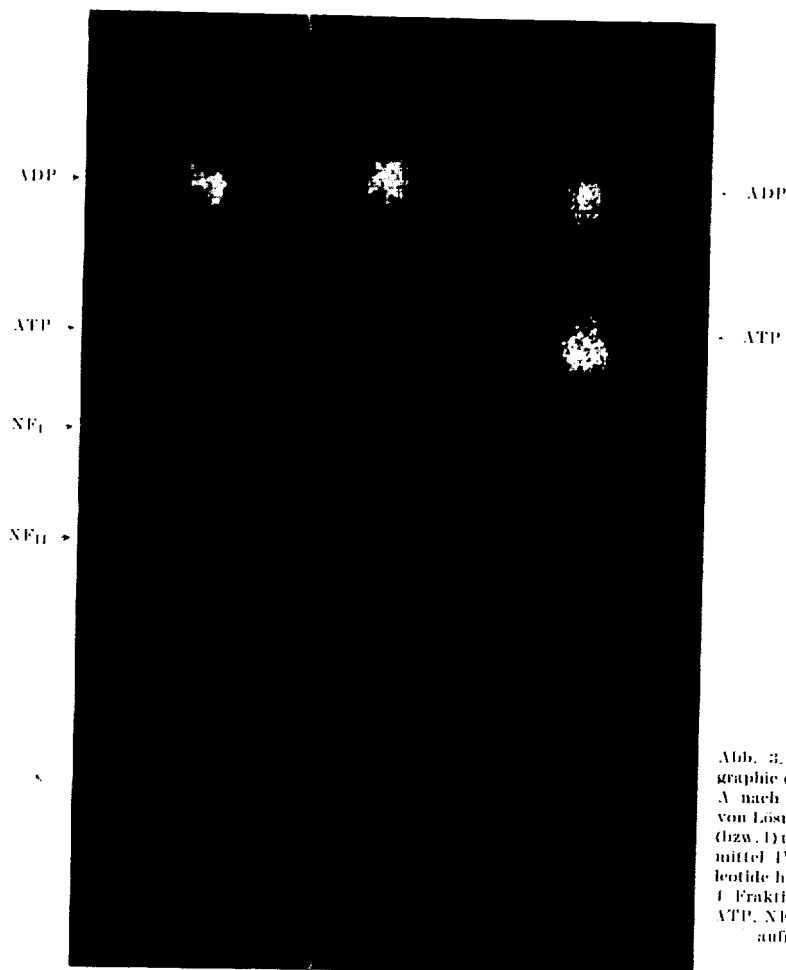
Abb. 1. Anwendung von Lösungsmittel I „absteigend“. Zur Auftrennung der Nucleotide in der Fraktion A wird das Ende EF des Papiers mit Orthophosphat und PGS in ca. 5 cm Entfernung von der Startlinie abgeschnitten und Lösungsmittel IV „absteigend“ in Richtung auf das Ende AB des Chromatogrammbogens angewendet.



Fraktion A

Testfleck von ATP + ADP

Abb. 2. UV-Photographie der mit Lösungsmittel II (bzw. I) chromatographierten Fraktion A. Die Nucleotide dieser Fraktion sowie ein Testfleck von ADP + ATP bleiben scharf begrenzt an der Startlinie zurück. Der Pfeil zeigt in dieser und den folgenden Abbildungen die Laufrichtung des Lösungsmittels an.



Fraktion A

Testflecke von ATP + ADP

Abb. 3. UV-Photographie der Fraktion A nach Anwendung von Lösungsmittel II (bzw. I) und Lösungsmittel IV. Die Nucleotide haben sich in 4 Fraktionen (ADP, ATP, NF1 und NF11) aufgeteilt.

Nach der Anwendung von Lösungsmittel II bzw. I und 1stündiger Zwischentrocknung (Zimmertemperatur) wird Teil CDEF des Papiers mit Orthophosphat und PGS parallel zur Startlinie in 5 cm Abstand davon abgeschnitten.

Zur Auftrennung der Nucleotide wird nunmehr Lösungsmittel IV bei 26° C „absteigend“ 2 mal nacheinander je 24 Std am Teil ABCD so angewendet, daß diese Verbindungen von der Startlinie auf das Ende AB des Chromatogrammbogens zuwandern, wobei sie sich in einem Teil des Papiers lokalisieren, der noch nicht von P-Verbindungen durchwandert ist. In dieser Anordnung lassen sich 4 Nucleotid-Fractionen getrennt erfassen. ADP lokalisiert sich am weitesten vorn, dahinter ATP und

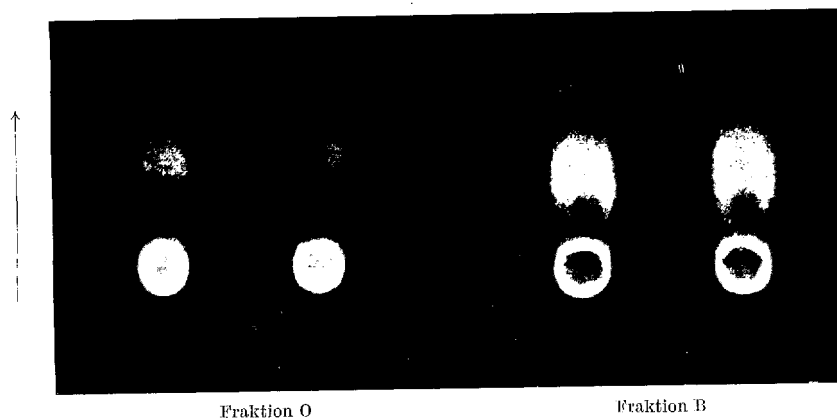


Abb. 4. UV-Photographie der gemeinsam mit Lösungsmittel I „absteigend“ chromatographierten Fraktionen O und B. Die Nucleotide dieser Fraktionen lokalisieren sich an und in geringem Abstand von der Startlinie. Die Fraktion B wurde stärker auf dem Papier angereichert.

noch mehr zurückbleibend 2 weitere Nucleotide, NF_I und NF_{II} (vgl. Abb. 3).

Fraktion B. Für die saubere Auftrennung der zahlreichen Bestandteile dieser Fraktion müssen verschiedene Arbeitsgänge durchgeführt werden.

1. Die Erfassung von Kr-P, Triosephosphaten und 2 weiteren, noch nicht identifizierten Verbindungen (Verbindung X und X_1) gelingt am einfachsten durch 2malige Anwendung von Lösungsmittel I bei 20° C „absteigend“ je 18 Std. Zu diesem Zweck wird die Fraktion B neben der Fraktion O auf die gleichen Papierbogen aufgetragen und beide Fraktionen gemeinsam chromatographiert.

Da Kr-P in der Fraktion B durch die Einwirkung des sauren Lösungsmittels seine Phosphatkomponente abspaltet, erfassen wir es als Orthophosphat, das allen anderen Verbindungen dieser Fraktion weit vorauswandert. Der Kreatinrest bewegt sich noch etwas rascher vorwärts und

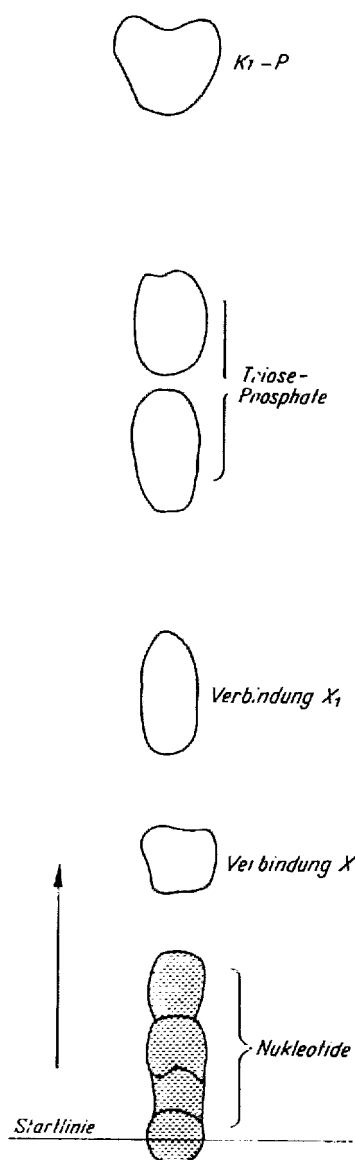


Abb. 5. Originalgetreue Chromatogrammpause, aus der die Position einiger getrennt erfaßbarer P-Verbindungen (K₁-P, 2 Triosephosphatfraktionen, Verbindung X₁ und Verbindung X) nach Anwendung von Lösungsmittel I „absteigend“ ersichtlich wird. Die Nukleotide verbleiben gemeinsam in Startlinienähe.

kann mit dem Pikrinsäurereagens nach WILLIAMS vor dem Orthophosphat sichtbar gemacht werden. Die Triosephosphate, deutlich in 2 Komponenten getrennt, lokalisieren sich hinter dem Orthophosphat in 5 bzw. 8 cm Abstand. Noch weiter zurück bleibt die Verbindung X₁. Zwischen die in der Nähe der Startlinie verbleibenden Nukleotide (vgl. Abb. 4) und Verbindung X₁ setzt sich, gut abgetrennt, Verbindung X. Als Pause eines solchen Chromatogramms zeigt Abb. 5 die Position der genannten Verbindungen.

2. Alle in der Fraktion B vorkommenden Nucleotide und einige weitere P-Ester werden durch 2-dimensionale Chromatographie getrennt erfaßt. 4 Papierbogen der Größe 35 × 55 cm mit je einem Startpunkt in 6 cm Abstand vom unteren und seitlichen Rand werden mit Lösungsmittel III bei 20° C 2 mal nacheinander je 18 Std „aufsteigend“ chromatographiert. Die Abb. 6 zeigt die UV-Photographie der vorgeordneten Nucleotide; in Abb. 7, einer Pause eines solchen Chromatogramms, ist die Position aller P-Verbindungen dargestellt.

Noch nicht eindeutig identifizierte Nucleotide dieser Fraktion sind als NF_{III}, NF_{IV}, NF_V und NF_{VI} bezeichnet. „S + P“-Verbindungen sind solche, die nachweislich Schwefel und Phosphor enthalten.

Nach der Vortrennung mit Lösungsmittel III erfolgt die 2-dimensionale Chromatographie. Hierfür werden die Chromatogrammbogen in Höhe des Startpunktes und 20 cm oberhalb davon abgeschnitten, so daß sie jetzt die Maße 20 × 35 cm haben (vgl. die Schnittlinien in Abb. 7). Bei 2 solchen Bogen kommt Lösungsmittel I (18 Std

bei 20° C), bei den beiden anderen Lösungsmittel IV (2 mal 24 Std bei 26° C) jeweils „absteigend“ in der neuen Längsrichtung der Papiere

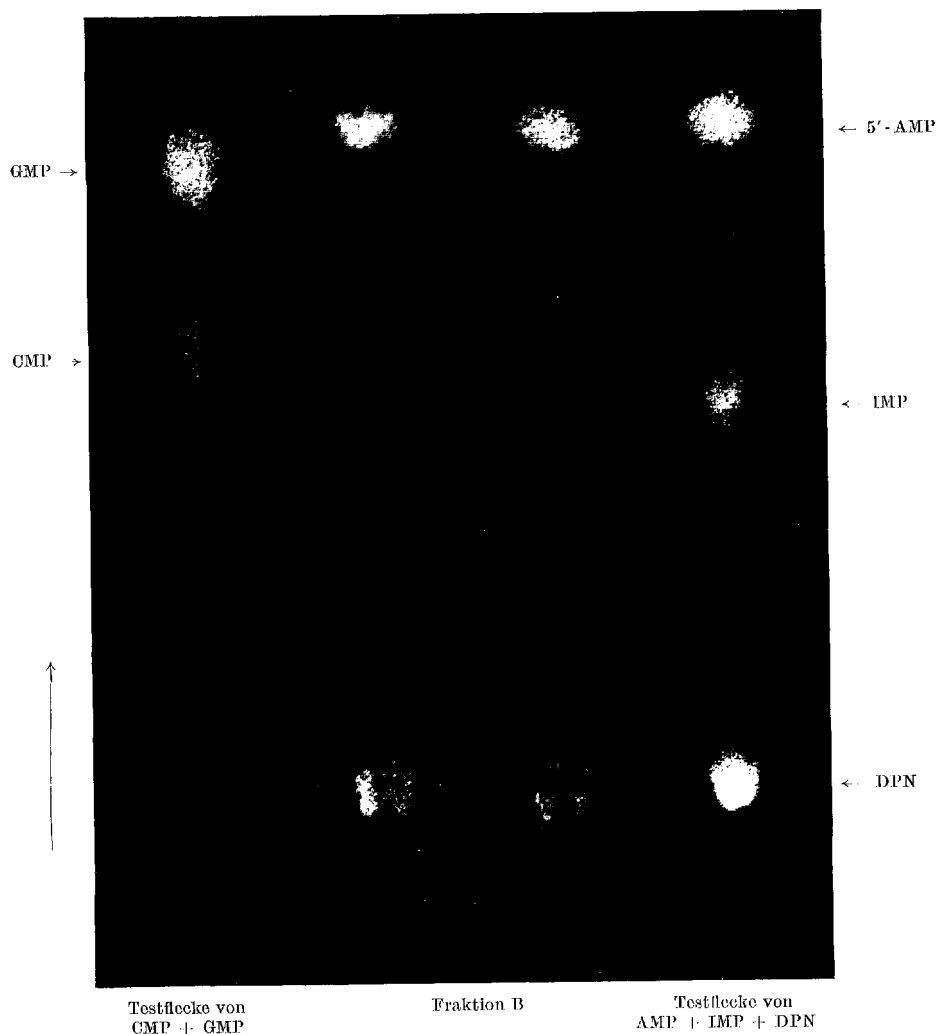


Abb. 6. UV-Photographie der mit Lösungsmittel III „aufsteigend“ vorgetrennten Nucleotide der Fraktion B. Mitchromatographierte Testsubstanzen: GMP, CMP, 5'-AMP, IMP und DPN.

zur Anwendung. Dadurch gelingt die gewünschte Trennung aller erfaßbaren P-Verbindungen.

Wie die Abb. 8, eine Chromatogrammpause, zeigt, trennt das saure Lösungsmittel I besonders gut Verbindung X vom AMP und Nucleotid NF_{III}. Alle anderen Nucleotide und P-Ester (CMP, IMP, NF_{IV}, NF_V, DPN, NF_{VI}, G-6-P, F-6-P) und

die „S + P“-Verbindungen werden mit dem ammoniakalischen Lösungsmittel IV so weit aufgetrennt, daß ihre isolierte Erfassung ohne Schwierigkeiten gelingt, wie aus Abb. 9, dem Ausschnitt einer UV-Photographie, und Abb. 10, der entsprechenden Pause eines fertigen 2-dimensionalen Chromatogrammes, ersichtlich ist.

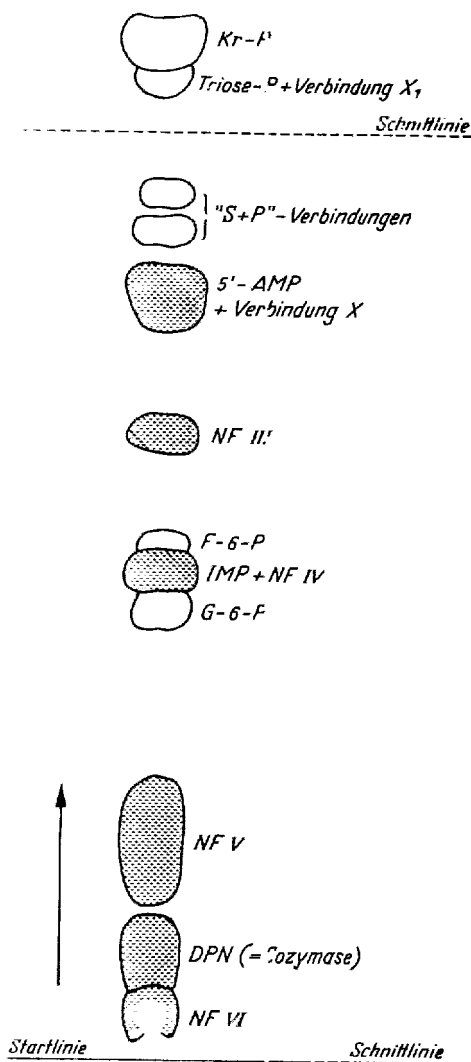


Abb. 7. Originalgetreue Chromatogrammpause, aus der die Position aller in Fraktion B vorkommenden P-Verbindungen nach der Anwendung von Lösungsmittel III „aufsteigend“ hervorgeht. Da nur eine unvollständige Trennung der meisten dieser Verbindungen zu erreichen ist, muß der zwischen den beiden Schnittlinien gelegene Teil des Papiers anschließend 2-dimensional chromatographiert werden.

Zur Beurteilung der kombinierten Arbeitsmethoden.

Bei Prüfung der Originalfällungsmethode nach LE PAGE an Erythrocytenextrakten fanden wir eine geringe Zunahme des Orthophosphatgehaltes nach der Fraktionierung gegenüber dem im TCS-Extrakt direkt bestimmten Wert für Orthophosphat. Erythrocytenextrakte mit ihrem außerordentlich geringen Gehalt an freiem Orthophosphat bei recht großen Mengen labiler P-Ester (FLECKENSTEIN u. GERLACH) eigneten sich für diese Kontrolluntersuchungen besonders gut. Nachdem zur Wiederauflösung der Fraktionsniederschläge nicht mehr HCl, sondern die schonendere Ameisensäure verwendet wurde, ließ sich keine Phosphatabspaltung während der Fraktionierung mehr nachweisen.

Die Frage nach der quantitativen Fällbarkeit der Bestandteile der einzelnen Fraktionen wurde an Erythrocyten- und Nierengewebsextrakten genau überprüft. Dabei ergaben sich als absolute Vorbedingungen für die Exaktheit der Fraktionierung:

a) der pH -Wert von 8.2 muß genauestens eingestellt

werden, da geringe Abweichungen zur sauren oder alkalischen Seite fast stets zur vorzeitigen oder verspäteten Ausfällung einiger P-Verbindungen führen;

b) nach Zusatz von Barium bzw. Äthanol dürfen die Niederschläge frühestens 20 bzw. 45 min später abgetrennt werden, da erst nach dieser Zeit eine vollständige Ausfällung gewährleistet ist.

Die Abtrennung der Bestandteile der Fraktion A von denen der Fraktionen B und C gelingt bei Einhaltung der geschilderten Bedingungen ohne Schwierigkeiten.

Jedoch genügt z. B. eine geringe Abweichung vom pH-Wert zur alkalischen Seite, um die Mitfällung einer kleinen Menge von AMP in der Fraktion A zu bewirken. Dies ist ohne weiteres an den UV-Photographien der chromatographierten Fraktion A erkennbar, da sich das AMP — entsprechend seiner größeren Wanderungsgeschwindigkeit — vor den anderen Nucleotiden an einer Stelle im Chromatogramm lokalisiert, die unter normalen Bedingungen keine UV-Absorption zeigt.

Von SACKS wurde darauf hingewiesen, daß eine wirklich quantitative Abtrennung der in Fraktion A vorkommenden P-Verbindungen nur durch kombinierte Barium-Calcium-Fällung zu erreichen sei. Wir konnten aber bisher bei der papierchromatographischen Aufarbeitung der Fraktionen A und B keinen Anhaltspunkt für eine solch unvollständige Fällung gewinnen, da nur in sehr wenigen Versuchen zu vernachlässigende Spuren von ATP, ADP und Orthophosphat in der Fraktion B erfaßt wurden. Allgemeingültige Aussagen über die Vollständigkeit einer Fraktionierung können sicher nur mit Vorsicht gemacht werden; denn in Abhängigkeit vom Gehalt eines Gewebsextraktes an mengenmäßig dominierenden Bestandteilen herrschen unterschiedliche Fällungsbedingungen. Zur endgültigen Klärung dieser Verhältnisse werden aber zur Zeit noch weitere Kontrollversuche durchgeführt.

Auch die Trennung der Bestandteile der Fraktion B von denen der Fraktion C verläuft in Nierenextrakten quantitativ; allerdings ergab

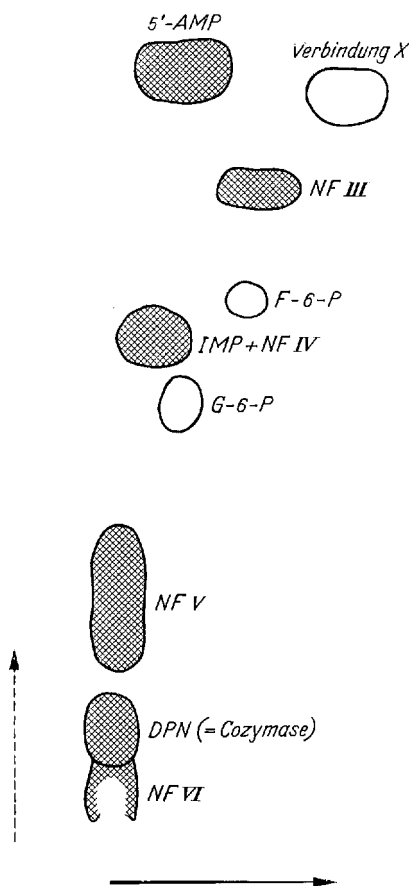


Abb. 8. Originalgetreue Chromatogrammpause, die nach 2-dimensionaler Chromatographie mit Lösungsmittel III (\dashrightarrow) und Lösungsmittel I (\rightarrow) die Abtrennung des AMP von Verbindung X sowie das Verhalten der übrigen P-Verbindungen zeigt.

sich die Notwendigkeit, statt des 4fachen das 5fache Volumen Äthanol für die Fällung der leichtlöslichen Ba-P-Ester zuzusetzen. Im Gegensatz zu einer Angabe von LE PAGE konnten wir sicherstellen, daß unter unseren Bedingungen auch DPN quantitativ in der Fraktion B erscheint, denn in der Fraktion C konnte keine Substanz mit UV-absorbierenden Eigenschaften mehr nachgewiesen werden.

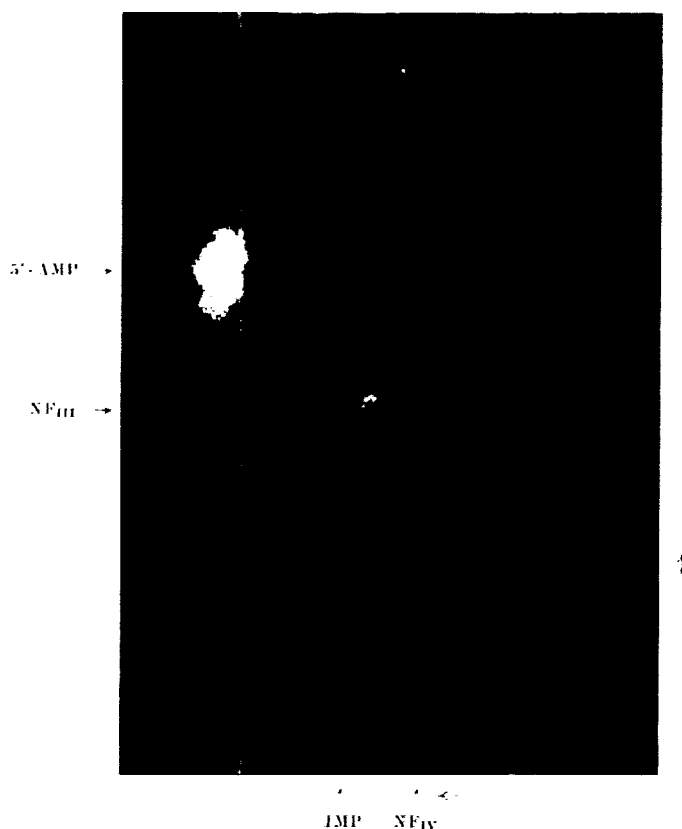


Abb. 9. Ausschnitt aus einer UV-Photographie nach 2-dimensionaler Chromatographie mit Lösungsmittel III (\rightarrow) und Lösungsmittel IV (\rightarrow). CMP und NFIII sowie IMP und NFIV sind nunmehr voneinander getrennt.

Flavinadeninnucleotide und andere Flavinderivate des TCS-Nierenextraktes verhalten sich bei der fraktionierten Fällung nicht einheitlich. Die Hauptmenge dieser Verbindungen ist zwar mit Barium fällbar und erscheint dementsprechend in der Fraktion A, jedoch wird noch ein kleiner Teil als leichtlösliche Bariumverbindungen in der Fraktion B wiedergefunden. Wegen dieses unterschiedlichen Verhaltens wurde in

unseren Versuchen auf die quantitative Bestimmung der Flavine verzichtet, zumal sich herausstellte, daß nur eine relativ sehr kleine Menge Phosphor auf sie entfällt.

Um zu klären, ob während der zum Teil recht langdauernden Chromatographie in den einzelnen Fraktionen labile P-Ester durch Einwirkung der sauren oder ammoniakalischen Lösungsmittel einen Teil

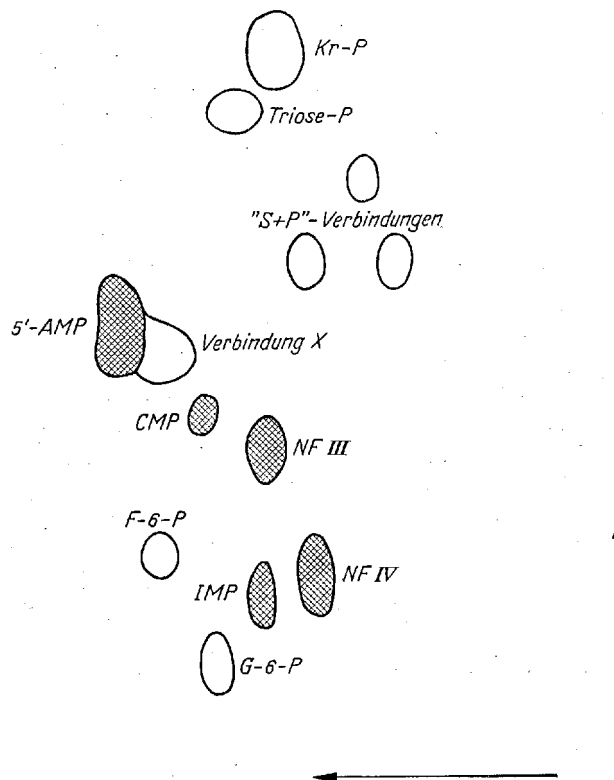


Abb. 10. Originalgetreue Chromatogrammpause, aus der die Position aller aufgetrennten P-Verbindungen der Fraktion B nach 2-dimensionaler Chromatographie mit den Lösungsmitteln III (---) und IV (->) hervorgeht.

ihres Phosphates hydrolytisch abspalten, wurden die fertigen Chromatogramme zusätzlich mit Lösungsmittel I chromatographiert. Hierdurch konnte geklärt werden, daß keine Verbindung Phosphat abspaltet, da die Areale, an denen sich dieses abgespaltene Orthophosphat lokalisieren würde, bei quantitativer Auswertung den Leerwert des Papiers ergaben. Allerdings dürfen keine Pausen zwischen den einzelnen Chromatographievorgängen eingelegt werden.

Nur Kr-P wird durch Anwendung saurer Lösungsmittel zerstört, worauf bereits hingewiesen wurde. Es war in diesem Zusammenhang wichtig, ob das in Fraktion B erfaßte Orthophosphat, das wir als nur aus Kr-P abgespaltenes ansehen, wirklich allein aus dieser Verbindung entsteht. Immerhin besteht die Möglichkeit, daß noch andere labile P-Ester in der Fraktion B Phosphat abspalten oder daß die Ausfällung des freien Orthophosphates mit Barium nicht quantitativ gelingt, wodurch von vornherein schon eine kleine Menge freien Orthophosphates in der Fraktion B vorhanden wäre. Durch Chromatographie der Fraktion B mit Lösungsmittel IV, in dem Kr-P als intakte Verbindung neben eventuell vorhandenem Orthophosphat erfaßt wird, konnte einwandfrei geklärt werden, daß in dieser Fraktion kein Orthophosphat vorkommt, und die nach Chromatographie mit sauren Lösungsmitteln auftretende Menge an freiem Orthophosphat genau übereinstimmt mit der im Kr-P gebundenen.

Für die Beurteilung der Genauigkeit unserer kombinierten Arbeitsweise war es notwendig, in jedem Versuch den Verlust an P-Verbindungen durch die chemische Vorfraktionierung zu erfassen und bei der Papierchromatographie der Fraktionen A und B zu bestimmen, wieviel Prozent des Gesamt-P-Gehaltes dieser Fraktionen in den isolierten P-Verbindungen wiedergefunden werden.

Die Differenz zwischen dem aus Fraktion O ermittelten säurelöslichen Gesamt-P und dem nach der Fällung in den Fraktionen A, B und C wiedererfaßten Phosphor ergibt in unseren Versuchen einen durchschnittlichen Verlust an P-Verbindungen von 9,4%. Dieser Wert entspricht durchaus dem Verlust, mit dem bei einer chemischen Fraktionierung kleinster Substanzmengen gerechnet werden muß.

Bei der papierchromatographischen Aufarbeitung entfallen auf die getrennt bestimmten P-Verbindungen durchschnittlich in Fraktion A 93,6%, in Fraktion B 91,5% vom jeweiligen Gesamt-P-Gehalt dieser Fraktionen; der Rest von 6,4% bzw. 8,5% wird nicht erfaßt.

Normalverteilung der säurelöslichen P-Verbindungen in Rattennieren.

Tabelle 1.

	γ P/g Feuchtgewicht	γ P/g Trockengewicht	μ mol P/g Feuchtgewicht	μ mol P/g Trockengewicht
Fraktion O	881	4190	28,4	135,0
Fraktion A	336	1600	10,8	51,6
Fraktion B	324	1542	10,45	49,8
Fraktion C	139	602	4,40	21,3

In der Tabelle sind die aus 20 verschiedenen Versuchen bestimmten Mittelwerte für den P-Gehalt der Fraktionen O, A, B und C getrennt in γ P- und μ mol P/g Feucht- und Trockengewicht aufgeführt. Die Werte in der Fraktion O geben den tatsächlichen Gesamtgehalt an säurelöslichem Phosphor in TCS-Nierenextrakt wieder; die übrigen Angaben zeigen die nach der Vorfraktionierung auf die Fraktionen A, B und C

entfallenden P-Mengen, die zusammen im Durchschnitt 90,6% des säurelöslichen Gesamt-P ausmachen.

Es ist jedoch zweckmäßig, als Bezugsbasis lediglich den P-Gehalt dieser 3 Fraktionen als „Gesamt-P_{A+B+C}“ mit 100% anzusetzen, da nur von dieser Menge ausgehend eine Aufschlüsselung in die einzelnen P-Verbindungen durchgeführt wird. Somit ergeben sich für die prozentualen Anteile jeder Fraktion am Wert für „Gesamt-P_{A+B+C}“: Fraktion A 42,1%, Fraktion B 40,5%, Fraktion C 17,4%.

Tabelle 2.

	%-P bezogen auf „Gesamt- P _{A+B+C} “	γ P/g Feuchtgewicht	γ P/g Trockengewicht	μmol/g Feuchtgewicht	μmol/g Trockengewicht	μmol P/g Feuchtgewicht	μmol P/g Trockengewicht
Orthophosphat	29,4	240,0	1135,0	7,75	36,1	—	—
Verbindung X	10,0	78,1	381,0	—	—	2,65	11,7
Adenosin-5'-monophosphat	5,7	44,4	216,0	1,44	7,0	—	—
Diphosphopyridinnucleotid (= Co-Zymase)	5,0	38,1	179,0	0,61	2,8	—	—
Kreatinphosphat	4,5	31,8	153,0	1,02	5,0	—	—
Adenosin-5'-diphosphat . .	3,8	30,4	145,0	0,49	2,4	—	—
Adenosin-5'-triphosphat . .	2,6	23,5	112,0	0,25	1,2	—	—
Nucleotidfraktion „NFIII“ .	2,1	16,6	78,0	—	—	0,54	2,6
Nucleotidfraktion „NFII“ .	2,1	16,6	78,0	—	—	0,54	2,6
Nucleotidfraktion „NFVI“ .	2,0	16,2	75,8	—	—	0,52	2,5
Nucleotidfraktion „NFV“ .	1,9	15,0	71,2	—	—	0,44	2,1
Verbindung X ₁	1,6	11,8	57,2	—	—	0,38	1,9
Glucose-6-phosphat	0,9	7,1	33,8	0,23	1,1	—	—
Fructose-6-phosphat	0,87	7,0	33,6	0,23	1,1	—	—
Nucleotidfraktion „NFI“ . .	0,87	7,0	33,6	—	—	0,23	1,1
2- und 3-Phosphoglycerinsäure	0,6	5,1	26,8	0,18	0,9	—	—
Inosin-5'-monophosphat . .	0,55	4,3	21,6	0,14	0,7	—	—
Triosephosphate	0,53	4,2	20,4	—	—	0,14	0,7
Drei „S + P“-Verbindungen	0,52	4,2	19,8	—	—	0,13	0,6
Nucleotidfraktion „NFIV“ .	0,51	4,1	19,2	—	—	0,13	0,6
Cytidin-5'-monophosphat . .	0,3	2,2	11,6	0,07	0,4	—	—

Die Übersichtstabelle zeigt für alle erfaßten P-Verbindungen Mittelwerte aus 20 getrennt durchgeführten Untersuchungen. Geordnet sind die Substanzen nach ihrem in der 1. Spalte angegebenen Prozentgehalt Phosphor, bezogen auf den Durchschnittswert für „Gesamt-P_{A+B+C}“. In den nächsten Tabellenspalten sind jeweils die Werte in γ P/g und für alle identifizierten P-Ester in μmol/g Feucht- und Trockengewicht wiedergegeben. Für alle noch unbekannten Verbindungen erfolgt schließlich in den beiden letzten Spalten eine Angabe in μmol P/g Feucht- und Trockengewicht.

Orthophosphat mit knapp 30% des Gesamt-P_{A+B+C} ist die absolut größte Fraktion. Damit ergibt sich für organisch gebundenen und den im Orthophosphat gebundenen Phosphor ein Verhältnis von 7:3.

Mit einer nicht-chromatographischen Arbeitsweise bestimmte Werte für säurelösliche P-Verbindungen in verschiedenen Organen und Geweben wurden 1948 von LE PAGE mitgeteilt. Vergleicht man diese Zusammenstellung der Verteilung von P-Estern im Nierengewebe mit unseren Angaben, so ergibt sich überraschenderweise, daß der von uns als Verbindung X an 2. Stelle in der Tabelle geführte P-Ester mit $2,65 \mu\text{mol P/g}$ Feuchtgewicht übereinstimmt mit der von LE PAGE erfaßten $\mu\text{mol-Menge}$ Glucose-6-phosphat. Wir konnten jedoch mit einiger Sicherheit ausschließen, daß die Verbindung X als Glucose-6-phosphat anzusehen ist, da das papierchromatographische Verhalten beider Verbindungen große Unterschiede aufweist. Glucose-6-phosphat finden auch wir im Nierengewebe, jedoch nur $0,29 \mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht. Die Frage, ob es sich bei unserer Verbindung X um die von LE PAGE als Glucose-6-phosphat angesprochene Verbindung handelt, muß solange noch unbeantwortet bleiben, bis die Identifizierung der Verbindung X gelungen ist.

AMP mit 5,7% des Gesamt- P_{A+B+C} und $1,44 \mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht folgt an 3. Stelle in unserer Tabelle. Schon 1930 wurde von EMBDEN u. DEUTSCHE die im Nierengewebe vorkommende Adenylsäure auf Grund ihrer Desaminierbarkeit durch Muskeldesaminase als „Muskeladenylsäure“ = 5'-AMP identifiziert. Diesen Befund konnten wir durch Anwendung von Lösungsmitteln, die eine Trennung des 3' (bzw. 2')-AMP von 5'-AMP gestatten, auch papierchromatographisch bestätigen.

Nur in seltenen Fällen wurden geringe Mengen einer Verbindung gefunden, die sehr wahrscheinlich als 3' (bzw. 2')-AMP angesprochen werden kann.

DPN (Co-Zymase nach v. EULER) mit 5% des Gesamt- P_{A+B+C} bzw. $0,61 \mu\text{mol/g}$ Frischgewicht bildet noch eine der größten P-Fractionen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß durch Extraktion des Gewebes mit eisgekühlter TCS die reduzierte Form der Co-Zymase, das DPN- H_2 , zerstört wird (HOLZER u. Mitarb.), und deshalb unser Wert für DPN nicht als Maß für die stationäre Konzentration des gesamten DPN in der Niere gelten kann. Der tatsächliche Wert für $\text{DPN} + \text{DPN-}H_2$ wird noch wesentlich höher liegen.

Es überrascht nicht, daß ein stoffwechselechemisch so tätiges Organ wie die Niere diesen recht großen Gehalt an DPN aufweist, da für die meisten fermentativen Dehydrierungsvorgänge die Mitwirkung von DPN oder aber TPN bewiesen wurde. H.v. EULER u. RÜCHELMEIN machten schon 1927 darauf aufmerksam, daß die in Nierengewebe mit einer fermentchemischen Bestimmungsmethode erfaßbare Co-Zymasemenge auffallend groß ist. Weiter konnten dann SYM, NILSSON u. v. EULER 1931 zeigen, daß die Nierenrinde etwa doppelt soviel Co-Zymase enthält wie das Nierenmark.

Auf die bisher identifizierten energiereichen P-Ester Kr-P, ADP und ATP entfallen zusammen etwa 10% des Gesamt- P_{A+B+C} . Die $\mu\text{mol-Werte/g}$ dieser 3 Verbindungen verhalten sich nach unseren Befunden im Durchschnitt wie 1,02 (Kr-P) : 0,49 (ADP) : 0,25 (ATP).

Im Gegensatz zu dem recht konstanten Kr-P-Gehalt des Nierengewebes sahen wir, daß der ATP- und ADP-Gehalt stärkere Schwankungen aufweist. So ergaben einige Versuche annähernd gleiche $\mu\text{mol-Werte/g}$ für ADP und ATP; im ganzen gesehen fand sich aber stets mehr ADP als ATP. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit Angaben von OLIVER über die Verteilung von ATP und ADP in Rattennieren.

Der mit älteren Methoden bestimmte ATP- und ADP-Gehalt verschiedener Gewebe scheint in den meisten Fällen zu hoch zu liegen, da wegen der Vielzahl von labilen P-Estern in solchen Geweben eine wirklich isolierte Erfassung dieser Verbindungen kaum gelingen konnte. So mag auch zu erklären sein, daß in parenchymatösen Organen früher mehr ATP als ADP gefunden wurde, dagegen in neueren, chromatographisch durchgeführten Untersuchungen, diese beiden Verbindungen als etwa gleich große Fraktionen erkannt werden bzw. ein Überwiegen von ADP über ATP festzustellen ist. Entsprechende Befunde wurden unlängst auch von RABINOWITZ u. Mitarb. für Lebergewebe mitgeteilt.

Einige weitere im Nierengewebe vorkommende Phosphorsäureester bzw. Nucleotide konnten als Fructose-6-phosphat, Triosephosphate, Phosphoglycerinsäure, Inosin-5'-monophosphat und Cytidin-5'-monophosphat identifiziert werden. Ihre $\mu\text{mol-Werte/g}$ sowie der auf sie entfallende prozentuale P-Gehalt sind der Tab. 2 zu entnehmen.

Zur Charakterisierung der noch nicht identifizierten Verbindungen kann folgendes angeführt werden:

Unbekannte Nucleotidfraktionen („NF“): Bei diesen Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich um solche Nucleotide, die in jüngerer Zeit in verschiedenen Geweben von mehreren Autoren (PALADINI u. LELOIR; HURLBERT; CABIB, LELOIR u. CARDINI; BERGKVIST u. DEUTSCH; HURLBERT u. POTTER; SMITH u. MILLS; SCHMITZ, HURLBERT u. POTTER; SCHMITZ) aufgefunden und als Di- und Triphosphate von Cytidin, Guanosin und Uridin sowie als Uridin-5'-diphosphatderivate erkannt wurden. Testsubstanzen dieser neuentdeckten Verbindungen standen uns nicht zur Verfügung.

Die in der Fraktion A erfaßte Verbindung NF_I zeigt übereinstimmende R_F-Werte mit Testsubstanzen von TPN. Eine endgültige Aussage über die Identität von NF_I mit TPN ist aber noch nicht möglich.

Verbindung X und X₁. Da diese beiden Substanzen keine UV-absorbierenden Eigenschaften aufweisen, kann es sich nicht um Nucleotide handeln. Trotz maximaler Anreicherung dieser Verbindungen auf den Chromatogrammen verliefen alle Zuckerfarbreaktionen negativ, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit eine Bindung des Phosphates an einfache Pentosen und Hexosen ausgeschlossen werden kann. Unter einer großen Zahl von Testsubstanzen wurden bisher noch keine P-Verbindungen gefunden, die in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen mit Verbindung X und X₁ übereinstimmende R_F-Werte ergeben. Durch Anwendung des Ammoniak-Resistenz-Testes wurde erkannt, daß beide Substanzen schwerhydrolysierbare Phosphatbindungen besitzen. Schließlich kann als weitere Eigenschaft dieser Verbindungen angeführt werden,

daß sie mit Barium leichtlösliche Salze bilden, entsprechend ihrem Vorkommen in der Fraktion B.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die in beträchtlicher Menge in Erythrocyten vorkommende 2,3-Diphosphoglycerinsäure nach Anwendung verschiedener saurer Lösungsmittel gleiches papierchromatographisches Verhalten wie die Verbindung X zeigt; lediglich in ammoniakalischen Lösungsmitteln lassen sich Unterschiede in den R_f -Werten dieser beiden Substanzen feststellen. Das gesamte Verhalten der Verbindung X legt die Vermutung nahe, daß es sich bei ihr um einen der 2,3-Diphosphoglycerinsäure verwandten P-Ester handeln könnte.

„S + P“-Verbindungen. Hier handelt es sich um 3 nicht UV-absorbierende Substanzen mit verschiedenen R_f -Werten. Der Schwefelanteil dieser Verbindungen wird erst nach reduktiver Aufspaltung mit KCN durch die Nitroprussidreaktion erfaßt; dies spricht gegen eine SH-Bindung und für S-S- oder andere leichter spaltbare S-Bindungen. Alle 3 Verbindungen enthalten Phosphor in Mengen von weniger als $0,1 \mu\text{mol/g}$ Frischgewicht. Die Vermutung liegt nahe, daß diese „S + P“-Verbindungen Bruchstücke des Coenzym A sind; dann müßte allerdings das Coenzym A nicht mehr eine freie SH-Gruppe am Äthanolamin-Rest tragen, sondern eine mercaptanartige S-Bindung, vielleicht nach Art der Acetylmercaptan-Bindung.

Immerhin wäre es auch möglich, daß in der Niere phosphorylierte schwefelhaltige Aminosäuren vorkommen. Co-Carboxylase konnte ausgeschlossen werden, da sie von den „S + P“-Verbindungen durch ihre UV-absorbierenden Eigenschaften und auf Grund ihres papierchromatographischen Verhaltens einfach zu unterscheiden ist.

Über die Abweichungen vom Durchschnittswert der Tab. 2 in den einzelnen Versuchen kann für die verschiedenen P-Ester gesagt werden:

Im Verlauf unserer von März bis August 1954 durchgeführten Untersuchungen konnten wir beobachten, daß der Gehalt der Nieren besonders an ATP und ADP in Abhängigkeit von der Jahreszeit bestimmte Änderungen erfährt. Die höchsten ATP-Werte und ein Verhältnis von ATP:ADP in $\mu\text{mol/g}$ von ungefähr 0,48:0,54 wurden im März und April gefunden; in den Sommermonaten fielen dann die ATP-Werte stärker ab als die von ADP, so daß sich bei den tiefsten Werten ein $\mu\text{mol/g}$ -Verhältnis von 0,19:0,39 einstellte. Im September durchgeführte Kontrollversuche ergaben ein Wiederanstiegen der ATP-Werte. Diese jahreszeitlich bedingten Schwankungen im ATP- und ADP-Gehalt konnten auch von FLECKENSTEIN u. JANKE über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren in Untersuchungen am Frosch-Rectus beobachtet werden. Überdies ist aus Diureseversuchen an Ratten bekannt (VOLLMER; HAAS), daß auch hierbei mit größeren Unterschieden in dem Verhalten von Sommer- und Winterratten zu rechnen ist.

Eine stärkere Abnahme des ATP- bei nur geringfügiger Verminderung des ADP-Gehaltes der Nieren konnte festgestellt werden, wenn die Ratten 4 Wochen lang mit einem vitaminarmen Körnerfutter ernährt worden waren. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, daß die Verteilung einiger P-Verbindungen im Nierengewebe durch die Nahrung beeinflusbar ist.

Während sich in sämtlichen Untersuchungen für säurelöslichen Gesamtphosphor, die meisten Nucleotide, sowie für Orthophosphat, Kreatinphosphat und besonders Verbindung X, von Tier zu Tier recht konstante Werte ergaben, wurden

zum Teil größere Schwankungen in dem Gehalt an Triose- und Hexose-P-Verbindungen beobachtet. Unsicher ist hierbei, ob diese Befunde zurückzuführen sind auf eine nichtkonstante Ausgangsstoffwechsellaage im Nierengewebe, oder ob sie hinreichend erklärt werden können durch individuelle Unterschiede in der Verteilung dieser Verbindungen.

Einblicke in die engeren Beziehungen zwischen dem Stoffwechsel der P-Verbindungen und der Funktion der Nieren sind wohl am besten zu erhalten, wenn durch Anwendung nierenwirksamer Substanzen und bestimmter Gifte der normale Stoffwechsel spezifisch beeinflußt oder blockiert wird.

Zusammenfassung.

1. Da eine direkte papierchromatographische Auftrennung aller im trichloressigsäuren Extrakt von Rattennieren vorkommenden Phosphorverbindungen wegen ihrer Vielzahl und der Ähnlichkeit in den R_f -Werten mit den verschiedensten Lösungsmittelsystemen nicht erreicht werden kann, ergibt sich die Notwendigkeit einer chemischen Vorfraktionierung. Durch eine modifizierte Barium-Alkohol-Fällung wird daher der trichloressigsäure Gesamtnierenextrakt in 3 Fraktionen unterteilt.

2. Zwei dieser Fraktionen, in denen die meisten Phosphorverbindungen enthalten sind, werden getrennt papierchromatographisch aufgearbeitet. Dabei gelingt es, mit neuentwickelten Lösungsmitteln unter Ausnutzung verschiedener Verfahren der Papierchromatographie 23 phosphorhaltige Verbindungen isoliert zu erfassen.

3. Zur Erkennung und Identifizierung dieser P-Verbindungen dienen: Ammoniak-Resistenz-Test, Photoprintverfahren, charakteristische Farbreaktionen, R_f -Wert-Bestimmung in bekannten und neuen Lösungsmitteln, Vergleichschromatographie mit Testsubstanzen, „Mischchromatographie“ und verschiedene andere Verfahren.

Die quantitative Auswertung erfolgt über die elektrocoulometrische Bestimmung des Phosphorgehaltes jeder erfaßten Verbindung.

4. Die an 20 Tieren getrennt durchgeführten Untersuchungen erlauben die Aufstellung einer Mittelwerttabelle über die Normalverteilung säurelöslicher Phosphorverbindungen im Nierengewebe. Ordnet man die Verbindungen entsprechend ihrem prozentualen P-Gehalt, bezogen auf den säurelöslichen Gesamtphosphor, so ergibt sich, daß Orthophosphat mit 30% die absolut größte Fraktion ist. Es folgt an zweiter Stelle eine noch nicht identifizierte Verbindung mit 10%. AMP mit 5,7% und DPN mit 5% finden sich regelmäßig in größeren Mengen als die 3 energiereichen Verbindungen Kreatinphosphat mit 4,5%, ADP mit 3,8% und ATP mit 2,6%. IMP, CMP und 6 noch nicht identifizierte Nucleotide sowie 5 verschiedene phosphorylierte Hexosen und Triosen finden sich nur in geringeren Mengen. Es werden außerdem 3 Verbindungen erfaßt, die Schwefel und Phosphor enthalten.

Verwendete Testsubstanzen.

Kreatinphosphat, Acetylphosphat, 2-Phosphoglycerinsäure, 3-Phosphoglycerinsäure, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Hexose-1,6-diphosphat, Phenol-brenztraubensäure, α -Glycero-phosphat, Adenosin-5'-monophosphat, Inosin-5'-triphosphat, Triphosphopyridinnucleotid, Diphosphopyridinnucleotid, Thiamin-monophosphat, Co-Carboxylase und Flavin-mononucleotide wurden uns von Herrn Prof. H. A. KREBS und Herrn Dr. R. E. DAVIES (British Medical Research Council, Unit for Research in Cell Metabolism, Dept. of Biochemistry, University of Oxford) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Adenosin-5'-triphosphat (tert. Na-Salz), Adenosin-3'-monophosphat, Adenosin-5'-monophosphat, Guanosin-monophosphat und Inosin-monophosphat von der Zellstoffabrik Waldhof, Mannheim-Waldhof.

3-Phosphoglycerinsäure (Ba-Salz) und verschiedene Präparate von Diphosphopyridinnucleotid (DPN 75, DPN 95 und hydriertes DPN) von der Firma C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim.

Cytidin-monophosphat von der Chem. Fabrik Deutsche Hoffmann-La Roche, Grenzach-Baden.

Guanosin-monophosphat (Na-Salz) und Hexose-1,6-diphosphat von dem Chem. pharm. Werk Dr. Georg Henning, Berlin-Tempelhof.

Uridin-monophosphat wurde von der Firma Light & Co. Ltd., England, bezogen.

Fructose-6-phosphat wurde durch saure Hydrolyse von Hexose-1,6-diphosphat als chromatographisch einheitliche Substanz selbst hergestellt.

Herrn Prof. EICHMOLTZ danken wir herzlich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und die vielseitige freundliche Förderung.

Dem Deutschen Komitee des „Williams-Waterman Fund of the Research Corporation (New York)“ gilt unser ganz besonderer Dank für die materielle Unterstützung.

Herrn Prof. H. A. KREBS und Herrn Dr. R. E. DAVIES sowie den Firmen: Zellstoffabrik Waldhof, C. F. Boehringer & Soehne, Deutsche Hoffmann-La Roche und Dr. Georg Henning sprechen wir unseren Dank aus für die Überlassung von Testsubstanzen.

Literatur.

BANDURSKI, R. S., and B. AXELROD: The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. of Biol. Chem.* **193**, 405 (1951). — BERENBLUM, I., and E. CHAIN: An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochemic. J.* **82**, 295 (1938). — BERGVIST, R., and A. DEUTSCH: Guanosine triphosphate and uridine triphosphate from muscle. *Acta chem. scand. (Copenh.)* **7**, 1307 (1953). — BLOCK, R. J., R. LE STRANGE and G. ZWIG: Paper Chromatography. New York: Acad. Press. Inc. 1952. — BURROWS, S., F. S. M. GRYLLS and J. S. HARRISON: Paper chromatography of phosphoric esters. *Nature (Lond.)* **170**, 800 (1952). — CABIB, E., L. F. LELOIR and C. E. CARDINI: Uridine diphosphate acetylglucosamine. *J. of Biol. Chem.* **203**, 1055 (1953). — CARTER, C. E.: Paper chromatography of purine- and pyrimidine-derivatives of yeast ribonucleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 1466 (1950). — CHARGAFF, E., C. LEVINE and CH. GREEN: Techniques for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipid constituents, sulfur containing amino acids, and reducing sugars. *J. of Biol. Chem.* **175**, 67 (1948). — CHERNICK, S. S., J. L. CHAIKOFF and S. ABRAHAM: Localization of initial block in glucose metabolism in diabetic liver sections. *J. of Biol. Chem.* **193**, 793 (1951). — CORI, G. T., and C. F. CORI: A method for the determination of hexosemonophosphate in muscle. *J. of*

- Biol. Chem. **94**, 561 (1932). — CRAMER, F.: Papierchromatographie. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie 1953. — EGGLESTON, L. V., and R. HEMS: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochem. J. **52**, 156 (1952). — EMBDEN, G., u. H. J. DEUTICKE: Über die Isolierung von Muskoladenylsäure aus der Niere. Z. physiol. Chem. **190**, 62 (1930). — v. EULER, H., u. D. RUNEHJELM: Co-Zymase-Gehalt verschiedener tierischer Gewebe. Z. physiol. Chem. **165**, 306 (1927). — FLECKENSTEIN, A., u. E. GERLACH: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Tauben-Erythrocyten verschiedenen K⁺-Gehalts. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **219**, 531 (1953). — FLECKENSTEIN, A., E. GERLACH u. J. JANKE: Ein neuer Schnelltest zur Identifizierung leicht und schwer hydrolysierbarer Phosphorsäure-Ester im Papierchromatogramm. Naturwissenschaften **40**, 462 (1953). — FLECKENSTEIN, A., u. J. JANKE: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177 (1953). — FLECKENSTEIN, A., J. JANKE, G. LECHNER u. G. BAUER: Zerfällt Adenosin-triphosphat bei der Muskelkontraktion? Pflügers Arch. **259**, 246 (1954). — FORSYTH, W. G. C.: Colour reagents for the paper chromatography of sugars. Nature (Lond.) **161**, 239 (1948). — GERLACH, E., E. WEBER u. H. J. DÖRING: Einigeneue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern. Biochem. Z.: im Druck. — HAAS, H.: Private Mitteilung. Pharmakol. Laborat. der Chem. Fabriken Knoll AG, Ludwigshafen/Rh. — HANES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — HOCKENHULL, D. J. D.: A new spraying agent for paper chromatography of carbohydrates and polyols. Nature (Lond.) **171**, 982 (1953). — HOLZER, H., S. GOLDSCHMIDT, W. LAMPRECHT u. E. HELMREICH: Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen. I. Bestimmung stationärer DPN/DPNH-Konzentrationen in lebenden Zellen und Geweben. Z. physiol. Chem. **297**, 1 (1954). — HORROCKS, R. H.: Paper partition chromatography of reducing sugars with benzidine as a spraying reagent. Nature (Lond.) **164**, 444 (1949). — HURLBERT, R. B.: Uridine-5-phosphate compounds as intermediates in the incorporation of orotic acid into RNA. Federat. Proc. **12**, 222 (1953). — HURLBERT, R. B. and V. R. PORTER: Nucleotide metabolism. I. The conversion of orotic acid-6-C¹⁴ to uridine nucleotides. J. of Biol. Chem. **209**, 1 (1954). — ISHERWOOD, F. A., and M. A. JERMYN: Relationship between the structure of the simple sugars and their behaviour on the paper chromatogram. Biochem. J. **48**, 515 (1951). — LEHNARTZ, E.: Einführung in die chemische Physiologie. 10. Auflage. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — LE PAGE, G. A.: in „Manometric Techniques and Tissue Metabolism“. Ed. by W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER. Minneapolis: Burgess Publishing Co., II. Edit. Chapter XV. — Phosphorylated intermediates in tumor glycolysis. Cancer Res. **8**, 193 (1948). — MARKHAM, R., and J. D. SMITH: Chromatographic studies of nucleic acids. I. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. Biochem. J. **45**, 294 (1949). — MUDGE, G. H., and J. V. TAGGART: Effect of 2,4-dinitrophenol on renal transport mechanism in the dog. Amer. J. Physiol. **161**, 173 (1950). — OLIVER, I. T.: Private Mitteilung durch Dr. R. E. DAVIES (British Medical Research Council, Unit for Research in Cell Metabolism, Dept. of Biochemistry, University of Oxford). — PALADINI, A. C., and L. F. LÉLOIR: Studies on uridine-diphosphate-glucose. Biochem. J. **51**, 426 (1952). — PARTRIDGE, S. M.: Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature (Lond.) **164**, 443 (1949). — RABINOWITZ, J. C., G. JACOBS, L. J. TERPY, V. H. CHELDELIN, E. DIMANT, H. R. MAHLER and

522 GERLACH u. WEBER: Papierchromatographische Trennungsmethode.

F. M. HUENNEKENS: The incorporation of ^{32}P -labelled orthophosphate into nucleotides. *Biochim. et Biophys. Acta* 13, 413 (1954). — SACKS, J.: A fractionation procedure for the acid-soluble phosphorus compounds of liver. *J. of Biol. Chem.* 181, 655 (1949). — SCHMITZ, H.: Isolierung von freien Nucleotiden aus verschiedenen Geweben. III. Mitt. Vorkommen von Nucleosid-5'-phosphaten im säurelöslichen Extrakt aus Hefe. *Biochem. Z.* 325, 555 (1954). — SCHMITZ, H., R. B. HURLBERT and V. R. POTTER: Nucleotide metabolism. III. Mono-, di- and triphosphates of cytidine, guanosine and uridine. *J. of Biol. Chem.* 200, 41 (1954). — SIEKEVITZ, PH., and V. R. POTTER: The effect of 2,4-dinitrophenol and of fluoride on oxydations in normal and tumor tissues. *Cancer Res.* 13, 513 (1953). SMITH, E. E. B., and G. T. MILLS: Uridine nucleotide compounds of liver. *Biochim. et Biophys. Acta* 18, 386 (1954). — SYM, E., R. NILSSON u. H. v. EULER: Cozymasegehalt verschiedener tierischer Gewebe. *Z. Physiol. Chem.* 190, 228 (1930). — TAGGART, J. V., and R. P. FORSTER: Renal tubular transport: effect of 2,4-dinitrophenol and related compounds on phenol red transport in the isolated tubules of the flounder. *Amer. J. Physiol.* 161, 167 (1950). — TOENNIES, G., and J. I. KOLB: Techniques and reagents for paper chromatography. *Analyt. Chemistry* 23, 823 (1951). — VOLLMER, H.: Über die Wirkung einmaliger Coffeininjektionen auf Mineralausscheidung und Harnmenge. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 194, 551 (1940). — WILLIAMS, R. J.: Referiert in „Paper Chromatography“, by R. J. BLOCK, R. LE STRANGE and G. ZWIG. New York: Academic Press Inc. 1952. S. 142. — WITTER, R. F., E. H. NEWCOMB and E. STOTZ: Studies of the mechanism of action of dinitrophenol. *J. of Biol. Chem.* 202, 291 (1953). — ZETTERSTRÖM, R., and M. LJUNGGREEN: The renewal of phosphate in acid-soluble nucleotides in the liver and the brain. *Acta enom. scand. (Copenh.)* 5, 291 (1951).

Dr. E. GERLACH, Heidelberg, Pharmakol. Inst. der Universität.